

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**VALORACIÓN NO INVASIVA DE LA GESTIÓN Y LA  
EMBRIOGÉNESIS EN RATÓN MEDIANTE TÉCNICAS  
DE IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María del Pilar Pallarés García**

Bajo la dirección del doctor  
Antonio González de Bulnes López

**Madrid, 2009**

• ISBN: 978-84-692-1032-1

©María del Pilar Pallarés García, 2008



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Veterinaria**

**Valoración no invasiva de la gestación y la embriogénesis  
en ratón mediante técnicas de imagen ultrasonográfica**

**María del Pilar Pallarés García**

**Madrid, 2008**

*A mi hijo Alex, que ahora tiene 8 años...*

*Este trabajo es una muestra plausible  
de que a pesar de las adversidades,  
es posible alcanzar una meta  
trabajando con tenacidad, dedicación y paciencia...  
lo importante para lograrlo  
es tener aspiraciones,  
y saber imponerse las metas...*

*Cada desaire es una oportunidad de avanzar; si uno huye de los obstáculos o los evita, habrá echado a perder el futuro (...) La magnitud de mis metas no me asombrará aunque quizá tropiece antes de alcanzarlas.  
Si tropiezo me levantaré de nuevo y mis caídas no me preocuparán. (...)  
**Que otros construyan una cueva con su arcilla. Por mi parte construiré un castillo con la mía.***

*“El vendedor mas grande del mundo” (Og Mandino)*

Trabajo que presenta la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> María del Pilar Pallarés García para aspirar al grado de Doctor en Veterinaria.

Fdo.: María del Pilar Pallarés García  
Madrid, marzo de 2008





MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA



D. Antonio González de Bulnes López, Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria,

CERTIFICA:

Que la memoria que lleva por título: *"Valoración no invasiva de la gestación y la embriogénesis en ratón mediante técnicas de imagen ultrasonográfica"*, elaborada por la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> María del Pilar Pallarés García, ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Madrid, marzo de 2008.

Fdo.: Antonio González de Bulnes López

Este trabajo se ha realizado bajo el convenio CC07-018 relativo a actividades de investigación conjuntas de colaboración, entre la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.



## AGRADECIMIENTOS.

## INDICE

RESUMEN .....	21
SUMMARY.....	25
1.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS .....	29
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	35
2.1. El ratón como animal de laboratorio .....	37
2.2. Características reproductivas del ratón .....	38
2.3. Gestación y desarrollo embrionario .....	40
2.4. Diagnóstico y seguimiento de la gestación .....	46
2.4.1. <i>Métodos tradicionales</i>	
<u>Palpación abdominal</u> .....	46
2.4.2. <i>Nuevas metodologías: técnicas de imagen para estudios in vivo</i> .....	46
<u>Rayos X</u> .....	47
<u>Tomografía Computerizada</u> .....	48
<u>Tomografía por Emisión de Positrones</u> .....	49
<u>Imagen Óptica</u> .....	50
<u>Resonancia Magnética Nuclear</u> .....	51
<u>Ultrasonidos</u> .....	54
Tipos de sondas .....	54
Artefactos .....	57
Seguridad biológica de los ultrasonidos .....	58
Posibilidades de diagnóstico y seguimiento de gestación por US en ratón .....	55

<b>3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>63</b>
<b>ANIMALES.....</b>	<b>65</b>
<b>MANEJO DE LOS ANIMALES_.....</b>	<b>65</b>
<b>EQUIPOS DE ULTRASONOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>
<b>METODOLOGIA DE EXPLORACIÓN ULTRASONOGRÁFICA_.....</b>	<b>67</b>
<b>VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1. <u>Objetivo 1.</u> Utilidad de la ultrasonografía para el estudio de la gestación en ratón .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1.1. <u>Experimento 1.</u> Utilización de la ultrasonografía convencional para el diagnóstico precoz de gestación</b>	
<b>Animales y toma de datos .....</b>	<b>73</b>
<b>Análisis de los datos.....</b>	<b>73</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>74</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1.2. <u>Experimento 2.</u> Caracterización por ultrasonografía convencional de los cambios fenotípicos durante el desarrollo embrionario en diferentes genotipos de ratón</b>	
<b>Animales y toma de datos .....</b>	<b>79</b>
<b>Análisis de los datos.....</b>	<b>79</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>79</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>89</b>
<b>3.2. <u>Objetivo 2.</u> Utilidad de la ultrasonografía para la valoración de alteraciones en el desarrollo embrionario (retrasos en el crecimiento y/o mortalidad) en cepas con problemas reproductivos .....</b>	<b>93</b>
<b>3.2.1. <u>Experimento 3.</u> Utilidad de la ultrasonografía para la valoración de la frecuencia y momento de aparición de pérdidas embrionarias durante la gestación de hembras Nos3-KP y su control.</b>	

Animales y toma de datos .....	95
Análisis de los datos .....	95
Resultados .....	96
<i>3.2.2. Experimento 4. Utilidad de la ultrasonografía para la determinación de diferencias fenotípicas durante la embriogénesis en hembras gestantes Nos3 KO y su control.</i>	
Animales y toma de datos .....	97
Análisis de los datos .....	97
Resultados .....	97
<u>Discusión del Objetivo 2</u> .....	102
3.3 <u>Objetivo 3. Utilidad de la ultrasonografía biomicroscópica como técnica histológica virtual para la caracterización in vivo de cambios fenotípicos durante la embriogénesis en ratón</u> .....	105
<i>3.3.1. Experimento 5. Utilidad de la ultrasonografía biomicroscópica para la visualización microscópica in vivo de las estructuras embrionarias desde la implantación al final de la organogénesis.</i>	
Animales y toma de datos .....	107
Resultados .....	107
Discusión.....	113
4.-    DISCUSIÓN GENERAL .....	117
5.-    CONCLUSIONES .....	125
6.-    REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129
ANEXO 1 .....	143
ANEXO 2. ....	219



## AGRADECIMIENTOS

*Cuando veas una pequeña luz brillar, ¡síguela!  
Si te dirige al pantano, pues ya saldrás de él.  
Pero si no la sigues,  
toda tu vida vivirás arrepentido  
al no saber si esa era tu estrella....*

*Séneca.*

Consciente o inconscientemente, a lo largo de mi vida siempre he creído en las sabias palabras de Séneca, pero no habría conseguido seguir esta luz sola, muchos a mí alrededor han intervenido enormemente mostrándome su apoyo y confianza. A todas las grandes personas, que me han ayudado en esta aventura, mi más sincero agradecimiento:

A **Antonio**, mi director de tesis. No hay párrafo lo suficientemente amplio con el que pueda transmitir la enorme gratitud que siento hacia él. Me propuso tímidamente llamar a la puerta del apasionante mundo de la ecografía y me transmitió tranquilo y con paciencia, sobre la pantalla del ecógrafo, conocimiento y experiencias sorprendentes. Siempre había creído que ver algo con esta técnica era un acto de fe, y cuando me enseñó a abrir los ojos y observar aquellas asombrosas imágenes, me quedé impresionada. Con él descubrí las semanas de siete días de entusiasmo inagotable, en las que el trabajo no suponía esfuerzo. Ha logrado con un éxito rotundo que pudiera disfrutar, como si de un apasionante libro se tratara, de cada una de las páginas de este trabajo. Ha sido realmente un placer y un privilegio trabajar a su lado, con una constante ayuda altruista y desinteresada, dejando de ser director para convertirse en compañero. Siempre tendrá mi eterno agradecimiento.

¿Qué sería de esta tesis sin la ayuda de **Mª Ángeles**, su mujer? Esta es mi oportunidad para agradecer su paciencia, su silencioso pero importante apoyo desde ese otro lado y por sacar fuerzas en un difícil momento para leer y revisar este manuscrito.

A **Juan** mi "padre profesional" por brindarme la primera oportunidad en el reducido mundo del animal de laboratorio para los veterinarios hace 15 años. Por haber transformando con su singular energía mi ignorancia, en pequeñas gotas de conocimiento y experiencia. Por ser una muestra de empuje y constante superación. Confieso henchida de orgullo que ha sido mi maestro, además de un gran amigo y compañero.



A **Luís Miguel**, porque con él dejé de ver la genética desde un palco y aterricé como protagonista en el escenario de los roedores modificados genéticamente. Por su paciencia, comprensión, generosidad y calidad humana; por esos desayunos tan cordiales que años más tarde, cuando emprendí mi marcha en solitario, echaba de menos.

A **Leo**, que sin saberlo, colocó la semilla de esta tesis hace mucho tiempo, y me hizo comprender lo importante que podía ser para mi carrera profesional.

A **Berenice**, quien con sutileza no ha dejado de estar siempre ahí, por haber sabido descolgar el teléfono a tiempo para simplemente escucharme.

A **Xavi**, ¿Cuántos kilómetros de distancia? Pero siempre dispuesto a ayudar, sin pedir explicaciones, en los momentos buenos y en los malos.

A **Michel**, el chiquitín. Por su disposición, optimismo, por lograr dar forma a un proyecto europeo con el que me entusiasmé y me dio la fuerza para comenzar esta tesis.

A **Isabel Blanco**, por ser especial, única, cariñosa y buena, positiva. Por nuestros momentos inolvidables vividos juntas en el master.

A **Candelas**, que me ha demostrado ser íntegra, una gran amiga y compañera, por ese orden. Por su valor profesional. Aunque bromeemos con ello, sería un desperdicio para la ciencia que trabaje en el teleplancha.

A **Elena y Joseph**, por su especial cariño conmigo, puedo confesar sinceramente que es mutuo. Elena, "tu niña" por fin lee la tesis.

A **Nani**, por haberse dejado involucrar en todo esto sin poner nunca inconvenientes, y por abrirme las puertas de su departamento.

A los Chicos del animalario, **Irene, Sandra, Abel, Sara, Tamara, Virginia** por ayudarme especialmente en los últimos momentos, muy, muy difíciles para mí, por saber verme como Jefa pero sobre todo como persona. Sin su ayuda, no hubiese salido igual. Muchas gracias a todos, y especialmente a **Santi** compañero y amigo, por su apoyo moral y laboral. Aunque prometí no repetirlo, tengo que decírselo, aunque sea la última vez.... ¡Termina la carrera, serás un gran profesional!

Y, especialmente a mi familia, los grandes pilares de mi existencia....

A mi madre, **"la abuela Clarita"**. Por transmitirme los valores fundamentales de la vida que me han permitido llegar hasta aquí. Sin su ayuda e incondicional apoyo, no hubiese conseguido ver ni sentir todos estos años con alegría y desenfado. Ella merecía un espacio en la dedicatoria de este trabajo, pero finalmente y como siempre, ha cedido el puesto de honor a su nieto. Gracias por ser una gran madre, un modelo a seguir en la vida.

A **Alex**, mi hijo único, siempre mi pequeño, quien sin entender el significado ni la finalidad, ha permitido que algo virtual llamado "tesis" le robe horas y horas de esos entrañables momentos irrecuperables que disfrutábamos juntos. Espero que dentro de unos años pueda comprender lo importante que ha sido para mí su esfuerzo y aunque esas horas no se puedan rescatar, procuraré recompensarle con otras maravillosas.

A **Andrés**, el último en nombrar por estar ajeno al mundo de la ciencia, pero el mas importante. Por su amor incondicional, por lograr ver en mi esfuerzo mis esperanzas y hacerlas suyas. Por saber pronunciar la frase alentadora con ese toque de gracia en el momento oportuno. Por ser la estrella que alcancé siguiendo una luz hace 21 años y ha seguido caminando a mi lado desde entonces, incansable y paciente. Ahora, además quiero hacerle partícipe de este trabajo, porque él también lo ha hecho posible.

Un agradecimiento especial a **Gráficas Rivadeneyra** por su participación en la impresión y presentación de este trabajo, **Ana Vidaurrezaga** de Aloka España e **Isaac Cisneros** de Rx Cisneros Electromedicina, por la cesión de los aparatos requeridos en algunos de los ensayos.

No quiero olvidarme en este apartado, de aquellas personas, que durante el desarrollo de esta Tesis han intentado frenarla. Puedo decir felizmente, que han logrado cerciorarme de que **una crisis, es la mejor oportunidad para mejorar.**



## RESUMEN

El ratón es el animal de laboratorio mas utilizado en investigación, por poseer unas características peculiares como son su pequeño tamaño, fácil manejo, corto ciclo reproductivo y vital y, muy especialmente, su facilidad de manipulación genética, que han hecho de él un modelo único en el estudio de muchas enfermedades del hombre. Conseguir un adecuado manejo reproductivo que incluya un diagnóstico precoz de gestación resulta de gran interés para la gestión de una colonia, para el diseño de grupos experimentales homogéneos y para reducir el número de animales, evitando sacrificios innecesarios y permitiendo la reutilización de hembras no gestantes.

En humana y en otras especies animales, el diagnóstico de gestación se realiza habitualmente por *métodos directos* basados en la Ultrasonografía (US), que ofrecen como ventaja la posibilidad de un estudio dinámico en tiempo real, con periodos de examen cortos, sin efectos secundarios y a un coste relativamente asequible. Con la US, además de diagnosticar la gestación, es posible determinar el número de fetos y su viabilidad. Por ser una técnica no invasiva, permite elaborar observaciones secuenciales a lo largo de la gestación, resultando muy útil para estudios de desarrollo y realización de fetometrías.

El objetivo general del desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral fue la **puesta a punto de la técnica de ultrasonografía para el estudio de la gestación en ratón y la valoración de sus posibilidades de aplicación práctica, tanto en manejo como experimentación**. Para ello, se desarrollaron tres objetivos específicos.

El **primer objetivo** buscaba estimar la **utilidad de la ultrasonografía convencional, con frecuencias de 7,5 a 10 MHz, para el diagnóstico precoz de la gestación, la determinación del número de embriones y el seguimiento del desarrollo embrionario en ratón**, con el fin de reemplazar otros procedimientos tradicionalmente usados e incrementar la eficiencia en el manejo de este animal de laboratorio. Para alcanzar este objetivo, se llevaron a cabo dos experimentos.

En el **primer experimento** se determinó que el diagnóstico más precoz de gestación puede realizarse en el Día 4,5 post-coito (pc), por visualización de los lugares de implantación. La determinación del número de embriones se pudo realizar a partir del

Día 6,5 pc; sin embargo, la eficiencia de este cómputo no es muy alta, y se tiende a una sobreestimación en hembras de gran prolificidad. Cuando la exploración se realiza a partir del Día 8,5 de gestación, la técnica puede ofrecer una alta precisión, sensibilidad, especificidad y eficiencia total, alcanzando el 100%. Estas determinaciones pueden realizarse utilizando sondas de 10 MHz, tanto lineales como sectoriales; sin embargo, la resolución de las imágenes fue muy baja utilizando sondas de 7,5 MHz, debido a la ausencia de líquido amniótico en las vesículas embrionarias, que impide distinguir correctamente los cuernos uterinos del contenido abdominal y visualizar los lugares de implantación.

En el segundo experimento se llevó a cabo el seguimiento de la gestación. El uso de sondas de 10MHz de frecuencia permitió observar detalladamente la organogénesis y obtener medidas representativas del crecimiento embrionario. Las primeras medidas que se obtuvieron, desde el Día 4,5 de gestación, fueron el diámetro longitudinal y transversal, y el área total, de la vesícula embrionaria; los valores de estas mediciones crecen de forma exponencial durante la gestación y están altamente correlacionadas con la edad gestacional. Los mismos resultados fueron establecidos para las medidas longitudinales y transversales del embrión. En estadios de gestación más avanzados, debido a la posición en "C" de los fetos, resultó más difícil obtener estas medidas y se utilizaron determinaciones aceptadas en otras especies, como el diámetro occipito-nasal y el diámetro biparietal. Ambas medidas resultaron fáciles de caracterizar y mostraron también en esta especie una alta correlación con la edad gestacional.

El segundo objetivo buscaba **determinar la utilidad de la ultrasonografía convencional para la valoración de alteraciones en el desarrollo embrionario (retrasos en el crecimiento y/o mortalidad) en cepas modificadas genéticamente y que presentan problemas reproductivos**. Se utilizaron como modelo las hembras de ratón *Nos3-KO*, en las que se han descrito trastornos reproductivos que conducen a una baja prolificidad, alta mortalidad embrionaria y alteraciones postnatales, y se diseñaron dos experimentos para alcanzar este objetivo.

En el primero, tercer experimento de esta Tesis, se corroboró la utilidad de la ultrasonografía para diagnosticar pérdidas embrionarias y alteraciones de la viabilidad durante los periodos de implantación y posterior desarrollo embrionario. Los resultados indicaron, además, que las pérdidas coincidían con periodos tan críticos como la gastrulación o la formación del primordio cardíaco.

En el segundo, el cuarto experimento de esta Tesis, se llevó a cabo la determinación de alteraciones fenotípicas durante la embriogénesis que pudieran comprometer el desarrollo embrionario y la viabilidad post-natal. Los resultados indicaron la existencia de alteraciones en los patrones de crecimiento del embrión y sus membranas que se establecían en los mismos periodos que los hallazgos anteriores.

La valoración conjunta de ambos experimentos abre una vía de investigación para valorar las posibles causas de estas alteraciones en momentos determinados del proceso de morfogénesis. Este estudio exigiría un seguimiento dinámico detallado de la organogénesis mediante observaciones a nivel microscópico. La ultrasonografía convencional no ofrece la resolución necesaria para estos análisis. Por ello, el tercer objetivo de esta Tesis **buscaba valorar la utilidad de la ultrasonografía con frecuencias de 40 MHz (ultrasonografía biomicroscópica o UBM) para la caracterización *in vivo* de la embriogénesis en el ratón.**

En un quinto experimento, se llevó a cabo la observación con UBM de los cambios fenotípicos del embrión; completando un seguimiento dinámico de la morfogénesis del ratón desde la implantación, en el Día 4,5 pc, hasta el final de la organogénesis, en el Día 15,5 tras la cubrición. Las estructuras visualizadas eran equivalentes a las imágenes descritas previamente en estudios histológicos realizados durante esos días, y a las observables macroscópicamente en los embriones obtenidos de las hembras utilizadas en cada día del experimento. La UBM resultó también una técnica muy adecuada para la obtención de imágenes dinámicas de la circulación fetal y umbilical y del desarrollo del sistema cardiovascular.



## SUMMARY

The mouse is the laboratory animal most widely used for research purposes, due to some special characteristics like small size, easy management, short reproductive and life cycles, and, specially, its potential for genetic manipulation, which makes some mice strains exceptional models for the study of human diseases. Thus, the achievement of an adequate reproductive management including an early pregnancy diagnosis is very interesting both for running the animal facilities and designing experimental groups with adequate number of animals, avoiding unnecessary sacrifices of non-pregnant females.

In human and other animal species, pregnancy diagnosis is routinely performed by *direct methods* based on ultrasound imaging (US), which offers the possibility of dynamic real-time studies, in short observational period, without secondary effects and at reasonable cost. By using US, besides pregnancy diagnosis, it is also possible to determine the number and viability of the embryos. US, being a non-invasive technique, allows sequential observations in successive days during pregnancy, which is very useful for developmental and fetometric studies.

Thus, the **general objective** of current Thesis was the **incorporation and validation of ultrasonography for pregnancy observation in the mouse and evaluation of its use in practice, either for management or research**. Three specific objectives were designed.

The **first objective** aimed to estimate **the usefulness of conventional ultrasonography, with 7.5-10 MHz frequencies, for early pregnancy diagnosis, determination of litter size and screening of embryo development in the mouse**, looking for a method able to replace other traditional procedures and to increase the efficiency of mouse management. Two experiments were developed.

The **first experiment** established the earliest pregnancy diagnosis at Day 4.5 post coitum (pc), by visualization of implantation sites. The determination of litter size was possible from Day 6.5 pc; however, the efficiency was limited due to an overestimation in high-prolificacy females. After Day 8.5 pc, this technique offers 100% of accuracy, sensitivity, specificity, and total efficiency. These determinations can be done by using 10 MHz, both lineal and sectorial, probes; when using 7.5 MHz transducers, image resolution was very low due to the absence of amniotic fluid in the embryo vesicles, which impedes



differentiation of uterine horns from abdominal content and, hence, visualization of implantation sites.

The second experiment was design for studying embryo development in mouse. The use of 10 MHz probes allowed detailed imaging of organogenesis and representative measuring of embryo growth. The first measurements, from Day 4.5 pc, were the longitudinal and transversal diameters and the total area of the embryonic vesicle; these values increased exponentially during the pregnancy and were highly correlated with gestational age. Similar results were found for longitudinal and transversal embryo measurements. In most advanced pregnancy stages, due to the position in "C" of the foetus, it was more difficult to obtain these measurements and occipito-snout length and biparietal diameter were used. Both measures were found to be easy to characterize and highly correlated with gestational age.

The second objective aimed to determine the usefulness of conventional ultrasound for evaluation of alterations in embryonic development (growth retardation and/or mortality) in genetically-modified strains showing reproductive problems. Nos3-KO female mice were used as a model, since reproductive problems involving low prolificacy, high embryo mortality and postnatal alterations have been described. Two experiments were realized.

The first, third experiment of this Thesis, demonstrated the usefulness of ultrasonography for diagnosing embryo losses and viability alterations during the periods of implantation and embryo development. The results also showed that embryo losses coincided with critical periods like gastrulation and formation of cardiac primordium.

The second, the fourth experiment of current work, allowed the determination of phenotypic alterations during the embryogenesis which could compromise the embryo development and postnatal viability. The results indicated the presence of alterations in the growth patterns of embryos and their membranes, that were established in the same period that previous findings.

Data from both experiments open a new way for studying possible causes of these alterations in these stages of the morphogenesis process. These studies would demand a detailed dynamic study at microscopic level. Conventional ultrasonography doesn't offer enough spatial resolution. Hence, the third objective of current Thesis aimed to

evaluate **the utility of high frequency ultrasound (40 MHz, ultrasound biomicroscopy or UBM) for *in vivo* characterization of mouse embryogenesis.**

In a fifth experiment, UBM was carried out for assessing phenotypic changes in the embryo and developing a dynamic study of the mouse morphogenesis, from implantation, at Day 4.5 pc, to the end of the organogenesis, at Day 15.5 pc. The structures visualized were equivalent to previously described in histological studies realized during these days and similar to macroscopic images obtained from the females in each of the study day. The UBM also resulted to be a very adequate technique for obtaining dynamic images of the foetal and umbilical circulation and of the cardiovascular development.



## 1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El ratón es uno de los animales de laboratorio mas utilizados en investigación, debido a su pequeño tamaño, fácil manejo, corto ciclo reproductivo y vital y, principalmente, su facilidad de manipulación genética.

En la gestión de colonias de ratón, y en la misma utilización del ratón con fines experimentales, es esencial un adecuado manejo reproductivo, tanto por fines productivos, como experimentales y éticos. En otras especies, la aplicación de sistemas de diagnóstico precoz de gestación tiene un papel incuestionable en la mejora de los rendimientos productivos; puesto que reduce el intervalo entre partos, posibilita la inducción de un nuevo celo y cubrición en las hembras vacías, y facilita y abarata el manejo de los animales, mediante su organización por lotes y la suplementación de la dieta sólo en los realmente gestantes. Además, permite la identificación precoz de animales infértiles.

En el caso del ratón, se controla y planifica la reproducción continuamente para propósitos experimentales. Conocer, en estadios tempranos, el éxito o el fracaso de una cubrición resulta de gran interés, no solo para adecuar los animales necesarios a un objetivo experimental y obtener grupos homogéneos predecibles, sino también, en los estudios de desarrollo, para reducir el número de animales experimentales evitando el sacrificio y permitiendo la reutilización de hembras no gestantes. Estas actuaciones están en consonancia, además, con las recomendaciones de Russell y Burch para el uso de las 3R's (Refinamiento, Reemplazo y Reducción) en experimentación animal, ya que mejoran los resultados experimentales (refinamiento) y disminuyen el número de animales en los ensayos (reducción).

En el ratón, debido a su pequeño tamaño, carácter nervioso y breve tiempo de gestación, no son aplicables en la práctica rutinaria los *métodos indirectos* utilizados en otras especies para diagnosticar la gestación (por ejemplo, mediante análisis hormonales a partir de muestras sanguíneas). Por ello, el método tradicional para el control de la gestación es la palpación abdominal; sin embargo, no es una técnica precoz, porque se realiza a partir del Día 12,5-13,5 pc, y está muy condicionada por la experiencia del manipulador. Una alternativa en los estudios de desarrollo es la observación directa, que conlleva el sacrificio del animal, y la utilización de al menos una hembra por cada estadio en estudio, sin poder realizar un seguimiento individual en el tiempo.

En humana y en otras especies animales, el diagnóstico de gestación es realizado mediante técnicas de imagen no invasivas, como Rayos X (RX), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o Ultrasonografía (US). Principalmente esta última, ya que ofrece, como ventaja frente a las otras técnicas, la posibilidad de realizar estudios en tiempo real y de forma dinámica, en periodos de examen cortos y repetibles cada poco tiempo, sin efectos secundarios y a un coste relativamente asequible. La visualización por imágenes permite, además de diagnosticar la presencia o ausencia de gestación, determinar el número de fetos. Asimismo, la posibilidad de realizar observaciones secuenciales en el desarrollo, favorece la realización de fetometrías durante la gestación y aplicarlo a estudios experimentales en los que podría evitarse el sacrificio de animales observándolos en días consecutivos.

A partir de estas consideraciones, la presente Tesis Doctoral tiene como **objetivo general la puesta a punto de la técnica de ultrasonografía para el estudio de la gestación en ratón y la valoración de sus posibilidades de aplicación práctica, tanto en manejo como experimentación.**

Para alcanzar este objetivo general, planteamos **3 objetivos específicos** que se desarrollaron en los 5 experimentos de que consta la presente Memoria científica.

**1. El primer objetivo** buscaba estimar la **utilidad de la ultrasonografía convencional, con frecuencias de 7,5 a 10 MHz, para el diagnóstico precoz de la gestación, la determinación del número de embriones y el seguimiento del desarrollo embrionario en ratón**, con el fin de reemplazar otros procedimientos tradicionalmente usados e incrementar la eficiencia en el manejo de este animal de laboratorio.

Para ello se diseñaron dos experimentos:

Experimento 1. Evaluación de la precocidad, eficiencia, sensibilidad y especificidad de esta técnica para el diagnóstico de gestación y la determinación del número de embriones en tres de los genotipos más utilizados en experimentación (BALB/c, C57BL/6J y CD1).

Experimento 2. Determinación de la aptitud de esta técnica para el seguimiento y valoración de los cambios fenotípicos que se producen durante el desarrollo embrionario del ratón y para la determinación de diferencias por influencia del background genético.

2. El segundo objetivo pretendía determinar la utilidad de la ultrasonografía convencional para la valoración de alteraciones en el desarrollo embrionario (retrasos en el crecimiento y/o mortalidad) en cepas modificadas genéticamente y que presentan problemas reproductivos. Se utilizaron como modelo las hembras de ratón *Nos3-KO*, en las cuales se han descrito trastornos reproductivos que conducen a una baja prolificidad, alta mortalidad embrionaria y alteraciones postnatales.

Para alcanzar este objetivo se desarrollaron dos experimentos.

Experimento 3. Comparación de la frecuencia y el momento de aparición de pérdidas embrionarias, a lo largo de la gestación, en hembras gestantes *Nos3-KO* y su control.

Experimento 4. Determinación de diferencias fenotípicas durante la embriogénesis en hembras gestantes *Nos3-KO* y su control.

Estos trabajos fueron realizados con ultrasonografía convencional, con sondas de 10MHz, que resultaron adecuadas para alcanzar los objetivos previstos en el plan experimental, pero que presentaban baja resolución para estudios detallados de morfogénesis. Por ello, se planteó un tercer objetivo:

3. El tercer objetivo buscaba valorar la utilidad de la ultrasonografía con frecuencias de 40 MHz (ultrasonografía biomicroscópica o UBM) para la caracterización *in vivo* de la embriogénesis en el ratón. Objetivo que se corresponde con el Experimento 5 de la presente Memoria.





## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La utilización de animales como modelo para estudios experimentales ha aumentado de manera paralela al desarrollo de la actividad investigadora en Ciencias de la Vida. Desde el siglo XVIII se fue aceptando de forma gradual que los resultados de la investigación experimental contribuyen al bienestar del hombre y mejoran sus condiciones de vida. Sin embargo, fue a partir del siglo XIX cuando la experimentación animal se multiplicó rápidamente; no sólo en número total de animales, sino también en la diversidad de especies utilizadas.

Uno de los requisitos previos para el empleo de animales en investigación es el conocimiento exhaustivo de sus características biológicas y de sus condiciones de manejo. En biomedicina, el animal de laboratorio por excelencia es el ratón y, la especie mas utilizada es *Mus musculus* o ratón común, que representa aproximadamente el 80% de los animales vertebrados empleados para fines científicos.

## **2.1. El ratón como animal de laboratorio**

Las características que han hecho del ratón de laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en investigación científica son las relacionadas, principalmente, con su tamaño y ciclo vital.

Su pequeño tamaño facilita su manejo y manipulación, y evita la necesidad de grandes superficies de terreno para su mantenimiento. Su corto ciclo vital se relaciona con una temprana aparición de la pubertad y madurez sexual, breves periodos de gestación y rápido destete; siendo, además, una especie muy prolífica.

Por otro lado, no requiere cuidados demasiado específicos y posee un sistema inmune similar al de los humanos.

Pero, además, deben destacarse tres características fundamentales y de gran importancia para la investigación en las últimas décadas, y que le diferencian de otras especies utilizadas en investigación:

- 1) El genoma del ratón es muy similar al de los humanos. En el año 2002 se secuenció el genoma completo del ratón y se ha dejado muy claro que, a nivel genético, los

ratones y los hombres están bastante cercanos. En realidad no sólo tenemos aproximadamente el mismo número de genes (unos 30.000), sino que un 99% de nuestro ADN es idéntico. Este hecho proporciona a los investigadores una herramienta enormemente valiosa para estudiar el origen genético de muchas enfermedades y probar la eficacia de nuevos tratamientos contra los grandes males que afligen al hombre.

- 2) Soportan bien la consanguinidad, por lo que es posible obtener líneas de individuos genéticamente idénticos para los ensayos, disminuyendo la variabilidad en los resultados. Existen más de 1000 cepas congénicas genéticamente definidas, con considerables diferencias entre ellas y que, por ello, son utilizadas como modelos en diferentes líneas de investigación.
- 3) Es relativamente fácil elaborar un ratón modificado genéticamente, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, y conseguir un modelo concreto, prácticamente "a la carta".

## **2.2. Características reproductivas del ratón.**

El ratón es un mívrido del orden Rodentia con actividad principalmente nocturna siendo su máxima actividad entre 6-8 horas después del comienzo del ciclo de oscuridad. Los ratones silvestres viven en grupos fuertemente jerarquizados, y esto marca su actividad reproductiva, siendo la estructura de la población un pequeño harén o familia con un macho dominante de gran territorialidad. Esta territorialidad induce a que la reproducción tienda a ser estacional (primavera-verano), dependiendo de la facilidad en encontrar alimento. El ratón de laboratorio, aunque se ha adaptado en parte a la cautividad, sigue teniendo similitudes con su homólogo salvaje. Sus ritmos circadianos, o nictamerales, son reproducibles bajo las mismas condiciones de luz-oscuridad, temperatura, humedad, ausencia de ruidos, etc. Estos patrones ambientales son rigurosamente controlados para favorecer su manejo y reproducción, y en investigación, evitar variabilidad entre experimentos. Así, por ejemplo, la estacionalidad nutricional se ha eliminado; en condiciones favorables y manteniendo todos esos parámetros iguales, los ratones de laboratorio pueden reproducirse durante todo el año.

La jerarquización se mantiene, así, como el mayor condicionante de la actividad reproductiva. En el caso del **macho**, ésta se inicia al alcanzar la pubertad, entre las 6-8 semanas de edad; posteriormente, mantienen su fertilidad prácticamente durante toda su vida. Sin embargo, en un grupo de machos, existirá un líder y el resto serán subordinados, con alteraciones en la espermatogénesis y el comportamiento de cubrición. Por ello, para utilizar los machos subordinados, es necesario individualizarlos del grupo aproximadamente tres días antes. Esto se debe a que el número de espermatozoides maduros se recupera aproximadamente a los dos días, dependiendo de la línea. Por esto mismo, se recomienda también un descanso de al menos tres días entre montas.

Para realizar las cubriciones, habitualmente se introduce una hembra en la jaula del macho, asegurando así la fertilidad de las montas, que ocurren durante el periodo de oscuridad; la duración de estas montas puede variar desde 10 minutos hasta casi una hora.

Las **hembras** son púberes generalmente a las 6 semanas de edad, dependiendo del peso. Son poliéstricas, pero su ciclicidad está condicionada por efectos sociales. Así, existen también hembras dominantes y, si se alojan en grupo, las hembras subordinadas presentarán ciclos irregulares. Si se alojan en grupo sin presencia de machos, todas presentarán tendencia al anestro.

La introducción de un macho en el grupo inducirá la sincronización de los ciclos estrales en las hembras no gestantes (*efecto Whitten*) y, en las preñadas previamente por un macho diferente, la pérdida de gestación y aparición de un nuevo ciclo (*efecto Bruce*). La vida sexual de la hembra se prolonga hasta una edad bastante avanzada (13-14 meses de vida). Durante los primeros meses de este periodo, las gestaciones y partos pueden producirse de forma casi continua, debido a un rasgo particular que se conoce con el nombre del "celo posparto" y que consiste en la capacidad de presentar un celo fértil dentro de las 24 horas posteriores al parto. Este fenómeno permite que la hembra quede preñada inmediatamente, disminuyendo el intervalo entre partos.

En hembras no gestantes, el intervalo entre celos, el ciclo estral, dura entre 4-6 días, con un periodo de celo y receptividad sexual de 10-14 horas, coincidiendo con las horas nocturnas. Las hembras presentan ovulación múltiple (entre 8-12 horas después del inicio del celo, dependiendo de la cepa) y, por lo tanto, porta varios fetos en la misma gestación (entre 4 y 12, o más crías dependiendo de la línea). La eventual pérdida de

uno de los fetos, aunque puede ocasionar problemas en el parto, no impide la llegada a término de los otros, lo que presenta una ventaja evolutiva y resulta muy interesante en los estudios de desarrollo.

El rendimiento reproductivo de las líneas suele medirse por cinco parámetros:

- 1) Edad del primer apareamiento
- 2) Número de apareamientos fértiles
- 3) Número total de camadas durante la vida reproductiva.
- 4) Promedio de crías por camada
- 5) Número de crías destetadas.

Estos parámetros pueden mejorarse teniendo en cuenta los factores sociales y nutricionales y mediante un adecuado manejo reproductivo; este último, basado principalmente en un diagnóstico precoz y fiable de gestación que permita detectar las cubriciones fallidas, permitirá reducir el intervalo entre partos y, con ello, disminuir los periodos infértiles y aumentar número total de camadas.

### **2.3. Gestación y desarrollo embrionario.**

Las hembras de ratón, como otras especies, portan en sus ovarios miles de oocitos, que proceden de las células germinales primordiales denominadas ovogonias; estas células entran en meiosis y quedan detenidas en la profase de la primera división meiótica, constituyendo el oocito. El oocito está rodeado de una sola capa de células planas (pregranulosa); al conjunto se le denomina folículo primordial. En su evolución posterior, la capa de células que circunda al oocito sufrirá procesos de diferenciación y proliferación, dando lugar a varias capas de células cúbicas (granulosa); el conjunto se denomina folículo primario. Posteriormente, el folículo evolucionará hacia los estadios de secundario, terciario y preovulatorio, con la diferenciación de la capas interna y externa de las células de la teca, la formación del antrum folicular y los cambios funcionales que condicionarán su desarrollo hasta el estadio ovulatorio.

Momentos antes de la ovulación, y con la consiguiente liberación del oocito, se completa la primera división meiótica, en que se forma el primer cuerpo polar, y se inicia inmediatamente después la segunda división meiótica, que queda detenida en metafase. Tras la ovulación, las células del folículo ovárico se luteinizan y el folículo se

transforma en cuerpo lúteo. Los oocitos permanecen viables por 10-15 horas tras la ovulación y, en el caso de que se produzca fertilización, se finaliza la segunda división meiótica, lo que genera el segundo cuerpo polar.

El desarrollo embrionario, por tanto, comienza con la fertilización del oocito por el espermatozoide. En este periodo, y paralelamente al desarrollo del embrión, el útero se prepara para recibir una posible gestación. Para ello, se producen cambios en el epitelio que favorecen la implantación del blastocisto; una vez implantado, induce la formación de las criptas uterinas y una masa celular llamada tejido decidua, es el proceso denominado *reacción decidua*. En este periodo, el embrión ha ido generando las dos primeras líneas tisulares, **trofoectodermo y endodermo primitivo**, y, a partir de ellas, se formarán la placenta y el saco vitelino extraembrionario; estructuras imprescindibles para la interacción con la madre. Tras la implantación, el embrión tiene 3 líneas tisulares distintas, **trofoectodermo, endodermo primitivo y epiblasto o ectodermo primitivo**. El epiblasto está formado por unas 20-25 células situadas entre el trofoectodermo y el endodermo primitivo. Esas células están unidas pero son apolares y, tras la implantación, se reorganizan como un epitelio alrededor de una cavidad central (cavidad proamniótica). La gastrulación comienza en el Día 6 después del coito y, en ratón, se asocia con una rápida proliferación de las células del epiblasto, aumentando su número de unas 120 a aproximadamente 8.000, entre el Día 5,5 y el Día 7,5 pc; la gran mayoría de ellas son pluripotentes, es decir, pueden originar cualquier tipo de tejido. La gastrulación, por tanto, es un periodo muy importante en el que se origina el mesodermo, se produce la elongación del embrión, y cuando termina (entre los Días 6,5 y 8,5 pc) están ya formadas las tres líneas germinales primarias, el cuerpo básico y los órganos primordiales del futuro ratón. En este momento, los somitos están comenzando a diferenciarse a cada lado de la notocorda del embrión; y, como cada somito es el origen de un segmento vertebral y del tejido conjuntivo asociado, darán lugar a la columna vertebral.

El embrión de ratón, durante estas fases, está curvado dorsalmente en forma de "U" debido a que las líneas germinales inicialmente están invertidas; es decir, el ectodermo (que formará el tubo neural y capas superficiales) está en el interior de la vesícula y el endodermo (que formará el intestino) en el exterior. Posteriormente, en el estadio de somito temprano, entre los Días 8,5 y 9,5 pc, comienza un fenómeno denominado "*turning*" o rotación axial, en el que topográficamente el embrión se da la vuelta y, con ello, se produce una inversión de las capas germinales. Snell y Stevens (1966) sugieren que puede ser debido a que el embrión está muy compactado en el saco vitelino y

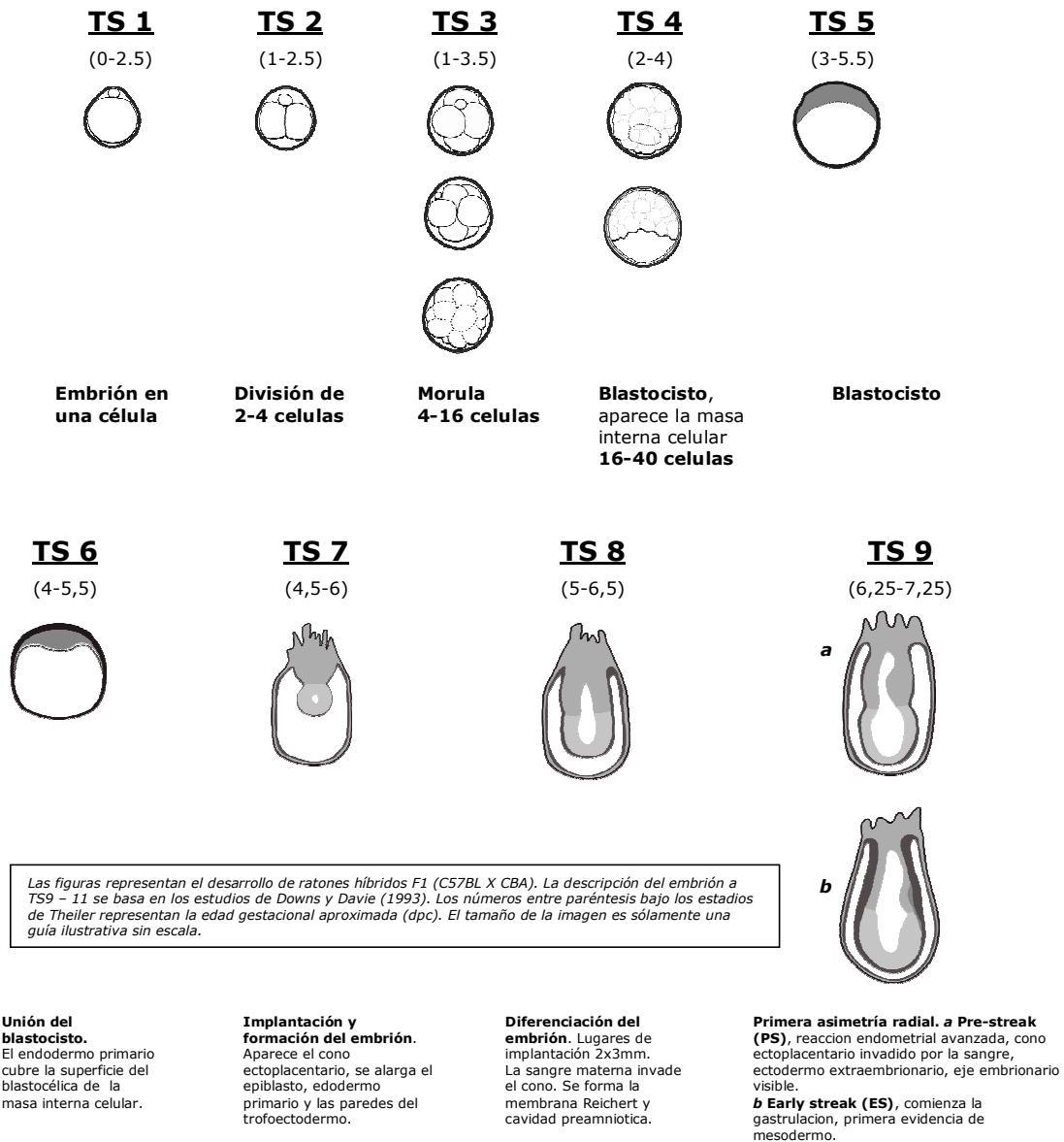
necesita más espacio para continuar su desarrollo. En este proceso, se curva ventralmente primero, luego gira y se cierra el tubo neural; posteriormente, aparecen pequeñas protuberancias que corresponden a las futuras extremidades y al primer y segundo arco branquial y, a los 9,5 días pc, adquiere la forma característica de embrión vertebrado en forma de "C". Este giro, además, es responsable de que el embrión se vea envuelto completamente por las membranas extraembrionarias. En este estadio ya se puede observar el primordio cardíaco como una estructura globular asimétrica, se establece el mesonefros que dará lugar a los riñones y el intestino aparece bien definido como un divertículo que se extiende caudalmente. En el sistema nervioso aparecen grandes cambios en la región cefálica.

La somitogénesis se extiende desde el Día 8,5 hasta el Día 14,5 de la gestación (Tam y Tan 1992) formándose 65 pares de somitos con un gradiente de maduración rostro-caudal. En el Día 10,5 pc, se observa la primera evidencia de la formación y diferenciación del arco aórtico pulmonar y se pueden reconocer la arteria carótida interna, la arteria aorta dorsal y los vasos umbilicales. Los miembros posteriores se hacen más evidentes y comienza la formación del lóbulo olfatorio, el tercer y cuarto arcos branquiales, la cola y la cresta urogenital; además, comienza la diferenciación del aparato digestivo y la apertura de la cavidad oral. En el Día 11,5 pc, los ojos ya aparecen pigmentados, los lóbulos pulmonares comienzan a diferenciarse, el estómago está considerablemente dilatado y se comunica el intestino con cordón umbilical. En el Día 12,5 pc, se origina la interdigitación de los dedos, la formación del meato acústico y se cierra la fisura nasomaxilar. Además, comienzan a diferenciarse la glándula tiroides, la faringe, y los primordios pancreáticos; el hígado ocupa ya un gran espacio en la cavidad abdominal. En el Día 13,5 pc, aparecen folículos pilosos bajo el labio y se forma la pituitaria; las cuatro cámaras cardíacas se evidencian fuera del cuerpo fácilmente. Entre los Días 14,5 y 15,5 pc, todo el cuerpo tiene folículos pilosos, se fusiona el paladar, finaliza la interdigitación y se eleva la cabeza.

Entre el Día 15,5 pc y el parto (Días 19,5-21,5 pc), el embrión aumenta más de peso y todos los órganos van madurando, preparándose para el nacimiento; aunque, en ratón, parte del desarrollo continúa después del parto, ya que las crías nacen sin pelo y no abren los ojos hasta pasados unos días.

Estos estadios han sido minuciosamente estudiados por Theiler (1989), observando que pueden existir cambios morfológicos del embrión/feto en el transcurso de pocas horas. Así, diferencia un total de 27 estadios, desde el día de la fertilización (0,5 pc) hasta el nacimiento, como se muestra en la Figura 1.

## Criterios de los estadios del desarrollo embrionario del ratón según Theiler Staging <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Atlas/intro.html>



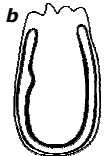
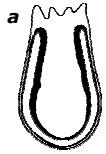
Estadios de Theiler (A) relacionados con los días de gestación (B)

A)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
B)	1	1	2	3	4	4,5	5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12	13	14	15	16	17	18	19



### **TS 10**

(6,5-7,75)



**a Mid streak (MS)**, el saco amniótico comienza a formarse.  
**b Late streak, (LSOB)**, exocoel.  
**c Late streak, (LSEB)**, primer brote de alantoides y cierre del amnios.

### **TS 11**

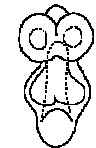
(7,25-8)



**a Placa neural (NP)**, proceso de desarrollo de la cabeza y amnios completo.  
**b Placa neural tardía (LNP)**, elongación del brote del alantoides  
**c Pliegue temprano de la cabeza (EHF)**  
**d Pliegue tardío de la cabeza (LHF)**. Invaginación de los primeros brotes de intestino

### **TS 12**

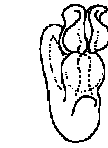
(7,5-8,75)



**Primeros somitos.**  
**1-4 somitos**, alantoides extendido, 1er arco branquial, cierre de los brotes intestinales, comienza la formación del corazón, vesículas preóticas, (en estado de somitos 2-3).  
**5-7 somitos**, alantoides y corion en contacto al final del TS12.  
**Ausencia del 2º arco**, >7 somitos

### **TS 13**

(8-9,25)



**Turning del embrión.** 1er arco branquial con componentes maxilares y mandibulares. 2º arco presente.  
**8-12 somitos.**  
**Ausencia del 3er arco.**

### **TS 14**

(8,5-9,75)



**Formación y cierre de la región anterior,** región ótica identificada pero no cerrada, 3er arco branquial visible.  
**13-20 somitos.**  
**Ausencia de brotes de las extremidades.**

### **TS 15**

(9-10,25)



**Formación del neuroporo posterior,** comienzan los brotes de extremidades, cerebro subdividido.  
**21-29 somitos.**  
**Ausencia de brotes de extremidades posteriores,** bolsa de Rathke

### **TS 16**

(9,5-10,75)



**Neuroporo posterior cerrado,** Formación de brotes de las extremidades posteriores y brote de la cola, bolsa de Rathke.  
**30-34 somitos.**  
**Ausencia de cola**

### **TS 17**

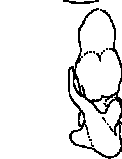
(10-11,25)



**Desarrollo del tubo neural,** se elonga la cola y comienza a formarse la hernia umbilical.  
**35-39 somitos.**  
**Ausencia de fosas nasales.**

### **TS 18**

(10,5-11,25)



**Cierre de vesículas,** fosas nasales, los somitos cervicales no se alargan visiblemente  
**40-44 somitos.**

### **TS 19**

(11-12,25)



**Lentes vesiculares completamente separadas del epitelio.**  
**45-47 somitos.**  
**Ausencia** de pigmentación en la retina y signos de dedos.

### **TS 20**

(11,5-13)



**Primeros signos de dedos,** pigmentación de la retina, lengua bien definida y vesículas cerebrales claras.  
**48-51 somitos.**  
**Ausencia** de los "bigotes".

### **TS 21**

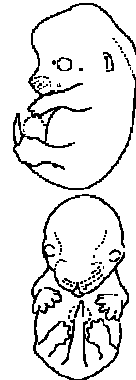
(12,5-14)



**Placa anterior indistinguible,** codo, muñeca y bigotes identificables. Hernia umbilical claramente diferenciable.  
**52-55 somitos.**  
**Ausencia** de folículos pilosos y dedos separados distalmente.

### **TS 22**

(13,5-15)



**Dedos separados distalmente,** folículos de pelo pectorales, pelvicos y de la región del tronco.  
**56-60 somitos.**  
**Ausencia** de folículos pilosos en región cefálica.

### **TS 23**



**Dedos separados,** folículos pilosos en la región cefálica pero no en vibrissas.  
**Ausencia** de primordio de uñas, paralelismo de dedos 2-5

### **TS 24**



**Reposición de hernia umbilical,** dedos de 2-5 paralelos, primordio de uñas visible en pies.  
**Ausencia** de pliegues en la piel.

### **TS 25**



**Piel con pliegues,** cierre de la piel sobre el ojo y hernia umbilical totalmente formada  
**Ausencia** de orejas sin pabellón auditivo formado.

### **TS 26**



**Grandes pliegues,** ojos visibles sobre la piel que los cubre, orejas con pabellón acústico.

### **TS 27**



**Nacimiento**

## 2.4. Diagnostico y seguimiento de gestación

El diagnóstico precoz de gestación tiene un papel incuestionable. En humana y en grandes animales se han desarrollado diferentes métodos para ello. Entre otros, los *métodos indirectos* (principalmente detección de hormonas) que resultan muy útiles en estas especies, pero que en el ratón no se pueden aplicar por el volumen y la frecuencia de extracción de sangre necesarios. En la práctica, se utilizan más los *métodos directos*, basados en técnicas de imagen y, principalmente, en la ultrasonografía.

### 2.4.1. *Métodos tradicionales*

#### Palpación abdominal

En realidad, existen pocos estudios que tengan como objetivo el desarrollo de un buen método de diagnóstico de gestación en ratón; el más usado tradicionalmente es la *palpación abdominal*. Sin embargo, ésta técnica presenta diversos inconvenientes; principalmente, que no es un método precoz porque se realiza a partir del Día 12,5-13,5 pc y en segundo lugar, que está muy condicionado por la experiencia del manipulador.

### 2.4.1. *Nuevas metodologías*

#### *Técnicas de estudio in vivo para el diagnóstico y seguimiento de la gestación en ratón.*

La imagen *in vivo* aplicada a animales es una excepcional herramienta no invasiva que permite realizar tanto estudios observacionales como mecánicos en campos relacionados con fisiopatología y respuesta a terapias en diferentes órganos y sistemas. Entre sus principales ventajas, destaca la adquisición de imágenes seriadas, sin sacrificio, en los mismos sujetos; lo que permite obtener datos dinámicos y la posibilidad de reducir el número de animales utilizados en un experimento. Asimismo, y aunque la resolución requerida es mayor que en humano, las tecnologías de imagen no invasiva para animales pequeños están evolucionando muy rápidamente con el fin de conseguir protocolos aplicables a estudios translacionales de animal a hombre.

Entre los posibles usos de la imagen *in vivo* destaca el diagnóstico y seguimiento de gestación y los estudios de morfogénesis. Si bien no todas las técnicas de diagnóstico son óptimas para la visualización de embriones y el seguimiento de gestación, las técnicas de imagen más utilizadas en investigación son las siguientes:

- Rayos X
- Tomografía Computerizada (CT o TAC)
- Tomografía por Emisión de Positrones (PET)
- Imagen Óptica.
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN)
- Ultrasonidos (US)

### Rayos X

La denominación Rayos X designa a una radiación electromagnética, invisible, con una longitud de onda de entre 0,1 a 10 nanómetros, correspondiendo a frecuencias en el rango de 30 a 3.000 MHz (de 50 a 5.000 veces la frecuencia de la luz visible). Esta radiación es capaz de atravesar cuerpos opacos y de impresionar las películas fotográficas. En realidad, una radiografía es una imagen registrada en una placa o película fotográfica. Esta imagen se obtiene al exponer dicha placa o película a una fuente de radiación de rayos X o radiación gamma procedente de isótopos radiactivos (Iridio 192, Cobalto 60, Cesio 137 u otros). Al interponer un objeto entre la fuente de radiación y la placa o película, las partes más densas aparecen con un tono más o menos gris en función inversa a la densidad del objeto.

Su descubrimiento fue realizado por Wilhem Röntgen en 1896; desde sus primeras aplicaciones para captar estructuras óseas, la tecnología necesaria para su uso en medicina se ha desarrollado notablemente.

Los Rayos X son especialmente útiles en la detección de enfermedades del esqueleto, aunque también se utilizan para diagnosticar enfermedades de algunos tejidos blandos, como neumonía, cáncer de pulmón, edema pulmonar y abscesos. Los Rayos X también se usan en procedimientos *en tiempo real*, tales como la angiografía, o en estudios de contraste. En otros casos, el uso de Rayos X resulta inútil, como por ejemplo en la observación del cerebro o los músculos. Las alternativas en estos casos incluyen la tomografía computerizada, la resonancia magnética o los ultrasonidos.

### *Posibilidades del diagnóstico y seguimiento de gestación por rayos X en ratón*

En un experimento previo que realizamos para comprobar las posibilidades de los rayos X para visualizar la gestación, comprobamos que es solamente útil en el último tercio de gestación, cuando comienzan a formarse los huesos (Figura 2). Por lo tanto, es una técnica muy limitada para nuestros objetivos. Pero además, no permitiría realizar el seguimiento de gestación, ya que requiere anestesia e inmovilización total del animal en el momento de la exposición a los rayos.



**Figura 2.** Observaciones mediante rayos X con exposiciones de 15 minutos/ 20 Kw, en hembras gestantes de 12,5 y 18,5 días pc. La observación de los fetos no es posible hasta el momento de la osificación, muy cercano al parto.

### Tomografía Computerizada

La tomografía computerizada, o tomografía axial computerizada (TAC), es una evolución de los rayos X que produce imágenes detalladas de cortes axiales del cuerpo mediante haces de rayos X médicos convencionales que se procesan por secciones. Para ello, el haz de rayos X incide sobre el objeto que se estudia y parte de la radiación del haz lo atraviesa. La radiación que no ha sido absorbida por el objeto en forma de espectro es recogida por los detectores, y el equipo clínico obtiene las imágenes de una sección del cuerpo. Posteriormente, va cambiando la orientación de rayos X y la película en direcciones opuestas durante la exposición, hasta que el tubo de rayos y los detectores han dado una vuelta completa. Un ordenador combina todas estas imágenes en una imagen final que representa un corte del cuerpo como si fuera una rodaja; en consecuencia, las estructuras del plano focal en estudio aparecen nítidas. Además, al

modificar el sentido y la amplitud del movimiento, los operadores pueden seleccionar diferentes planos focales que contengan las estructuras de interés.

En definitiva, es una técnica de diagnóstico utilizada en medicina mediante la que se obtienen cortes transversales a lo largo de una región concreta o de todo el cuerpo, permitiendo obtener múltiples imágenes por rotación del mismo (Paulus et al. 2000).

En animales pequeños se utilizan los sistemas CT de alta resolución que se denominan "microCT".

La Tomografía Axial es muy útil para el estudio de cánceres; permite la visualización nítida de huesos, estructuras medulares, tejido graso y espacios aéreos por el contraste entre los tejidos; pero, para el estudio de tejidos blandos, necesita combinarse con un medio de contraste. Por este último motivo, no es un método de elección para el diagnóstico de gestación. Pero, además, se reciben altas dosis de radiación ionizante; por ejemplo, en una TAC abdominal, se puede recibir la radiación de más de 50 radiografías de tórax, el equivalente a la radiación natural de más de cinco años.

#### Tomografía por Emisión de Positrones

La tomografía por emisión de positrones, (TEP o PET), por las siglas en inglés de Positron Emission Tomography, es una técnica de imagen no invasiva capaz de medir la actividad metabólica de los diferentes tejidos en tiempo real y mediante una imagen topográfica dimensional.

Para ello, se inyecta la sustancia cuyo metabolismo se desea investigar unida a un radioisótopo que emite positrones. Esta técnica permite detectar y analizar la distribución que adopta en el interior del cuerpo el radioisótopo, midiendo la producción de fotones gamma resultantes de la destrucción de los positrones emitidos por el radioisótopo. En base a ello, se construye una imagen basada en la decadencia del radioisótopo del agente trazador inoculado antes del comienzo de la sesión (Cherry 2004; Hutchins et al. 2008) Existen varios radioisótopos emisores de positrones de utilidad médica. Uno de los más importantes es el Flúor-18, capaz de unirse a la glucosa para obtener el trazador 18-Flúor-Desoxi-Glucosa (18FDG); es decir, se obtiene glucosa detectable mediante la emisión de señal radiactiva.

En pequeños animales existen scanner microPET que ofrecen resoluciones de imágenes de menos de 1mm y se han desarrollado combinaciones con Tomografía Computerizada (PET/CT) o con Resonancia Magnética Nuclear (PET/RMN), que han resultado ser importantes herramientas de imagen.

El PET se ha implantado con mucha fuerza como técnica diagnóstica en oncología; otras áreas que se benefician de este tipo de exploraciones son la cardiología, la neurología y la psicobiología, dada su utilidad para cuantificar el metabolismo tanto del sistema cardiovascular como del sistema nervioso central.

Sin embargo, no resulta útil para el diagnóstico y seguimiento de gestación; tanto por la inevitable anestesia como por la necesidad de inocular isótopos.

### Imagen Óptica

La imagen óptica aprovecha las propiedades físicas de la luz generada por distintos mecanismos (fluorescencia o bioluminiscencia) para ofrecer una imagen bidimensional.

La imagen por fluorescencia requiere un marcador fluorescente (un fluoróforo), una fuente para excitar la luz y un detector sensible a ella. Esta técnica se ha adaptado recientemente para estudios *in vivo* en animales pequeños (Graves et al. 2004; Hassan y Klaunber 2004; Monet et al. 2007) y se utiliza especialmente para diagnóstico de tumores; aunque tiene como inconveniente la presencia de interferencias por la fluorescencia natural de base que existe en el cuerpo. Recientemente, se ha comenzado a utilizar la imagen por fluorescencia en fibra óptica que permite visualizar *in vivo* con mínima invasión y resolución celular (Al- Gubory y Houdebine 2006; Pelled et al. 2006; Snedeker et al. 2006)

La bioluminiscencia tiene la misma base física que la fluorescencia pero, como marcador luminoso, se utiliza luciferasa, enzima de origen animal (Sato et al. 2004; Zhao et al. 2005; Shinde et al. 2006; Zinn et al. 2008).

Ambas técnicas se aplican principalmente en estudios de genes en oncología; teniendo en cuenta sus principios básicos de funcionamiento, no se han tenido en consideración como método para el diagnóstico de gestación.

### Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética (RM, también conocida como resonancia magnética nuclear o RMN) es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos. La RM permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos en la dirección de un campo magnético externo. Sus aplicaciones más frecuentes se encuentran ligadas al campo que se denomina Imagen por Resonancia Magnética nuclear (MRI, por sus siglas en inglés); técnica no invasiva que utiliza el fenómeno de la RM para obtener información sobre la estructura y composición del cuerpo a analizar. Esta información es procesada por ordenadores y transformada en imágenes del interior de lo que se ha analizado.

Los equipos de RMN son máquinas con muchos componentes que se integran con gran precisión para obtener información sobre la distribución de los átomos en el cuerpo a estudiar, utilizando el fenómeno de RMN. El elemento principal del equipo es un imán capaz de generar un campo magnético constante de gran intensidad. Actualmente se utilizan imanes con intensidades de campo de entre 0,15 y 7 Teslas. El campo magnético constante se encarga de alinear los momentos magnéticos de los núcleos atómicos básicamente en dos direcciones, paralela (los vectores apuntan en la misma dirección) y anti-paralela (apuntan en direcciones opuestas). La intensidad del campo y el momento magnético del núcleo determinan la frecuencia de resonancia de los núcleos, así como la proporción de núcleos que se encuentran en cada uno de los dos estados. La RMN es utilizada en la industria para analizar la estructura de materiales tanto orgánicos como inorgánicos; pero su principal aplicación es en medicina, para observar alteraciones en los tejidos y detectar cáncer y otras patologías. La alta resolución de la RMN permite distinguir materia gris de materia blanca en el sistema nervioso central, o embriones de ratón con resoluciones de hasta 100  $\mu\text{m}$  (Jacobs et al. 1999); aunque presenta como inconveniente la aparición de artefactos en sistemas dinámicos como el respiratorio o el cardiovascular (Jonson 2008).

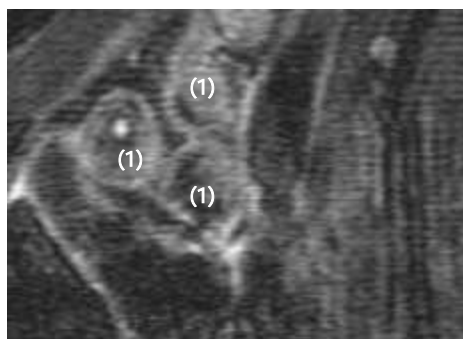
#### *Posibilidades del diagnóstico y seguimiento de gestación por RMN en ratón*

La RMN, por tanto, puede ser un método de elección para el diagnóstico y seguimiento de la gestación en el ratón. Por ello, en el desarrollo de esta Memoria, se ha realizado



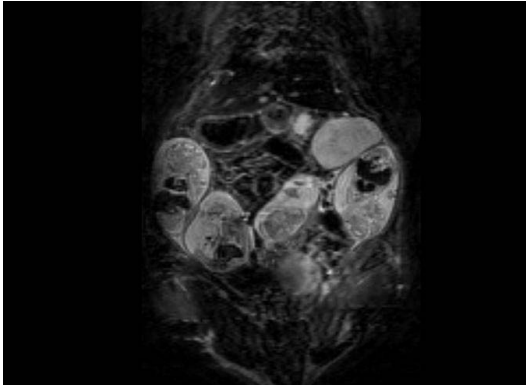
un experimento previo cuya finalidad era valorar la eficiencia de la RMN para observar *in utero*, y a nivel microscópico, la gestación y los cambios fenotípicos durante la morfogénesis del ratón, entre los Días 6,5 y 13,5 de gestación.

Para ello, se realizó la observación de la gestación en 5 hembras en momentos determinantes de la gestación (Días 6,5, 8,5, 11,5, 12,5, 13,5 y 14,5 pc). Las observaciones se realizaron, sobre los animales anestesiados con isofluorano y en decúbito prono, con un escáner BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) que operaba a 4,7 Teslas.

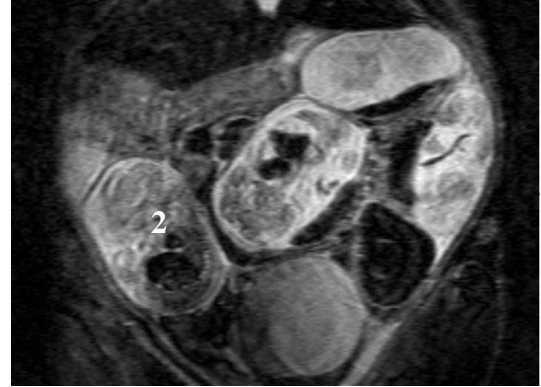


**Figura 3.** Imagen obtenida por RMN de una hembra gestante de 6,5 pc. Se observan los lugares de implantación (1).

En las sesiones realizadas en el periodo post-implantacional (Día 6,5 pc) es ya posible visualizar estructuras congruentes con la imagen de gestación; concretamente con la reacción decidual propia de los lugares de implantación (Figura 3). El estudio realizado con RMN en estadios mas tardíos (Día 8,5 pc) permite una visualización más nítida de las vesículas; la imagen de los sacos gestacionales con sus embriones y placenta son claramente observables en las sesiones realizadas entre los Días 11,5 y 14,5 pc (Figuras 4 y 5).

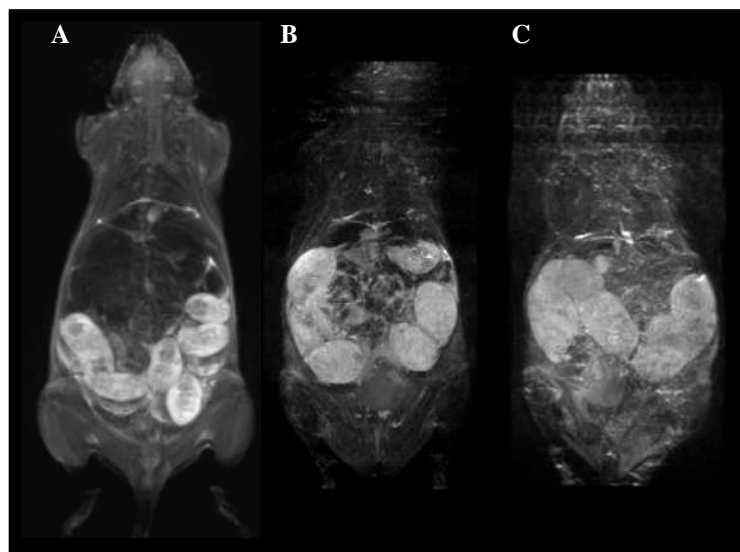


**Figura 4.** Imagen obtenida por RMN de una hembra gestante de 11,5 pc. Se observan los sacos gestacionales.



**Figura 5.** Imagen obtenida por RMN de una hembra gestante de 14,5 pc. Osificación de columna y cavidades cefálicas (2).

En todas las sesiones, la posibilidad de visualizar el cuerpo completo de la madre fue determinante para contar adecuadamente el número de fetos cuando se utiliza la opción 3-D (Figura 6). Pero, además, la RMN podría ser de gran interés para estudios de letalidad en el embrión y retardo del crecimiento uterino, debido a la posibilidad de visualizar el útero completo y todas las estructuras del embrión. Sin embargo, su uso se ve limitado por la necesidad de anestesiarse a la madre, que imposibilita estudios secuenciales, y por los largos tiempos de examen en cada sesión, que comprometen su supervivencia. Por otro lado, el uso de RMN para estudios dinámicos del desarrollo del sistema cardiovascular del embrión y la circulación embrio-placentaria se ve limitado por la necesidad de altas dosis de agentes de contraste, como quelato de gadolinio, (Teillieu et al. 2006; Yeh 2006).



**Figura 6.** Imágenes 3-D obtenidas por RMN a hembras gestantes a 11,5 pc (A), 12,5 pc (B) y 14,5 pc (C)

## Ultrasonidos

El ultrasonido (US) se define como una onda acústica que se propaga a través de un medio en forma de vibración mecánica elástica con una frecuencia de vibración superior a 30.000 Hz (Legrand y Carlier 1981). Se denomina frecuencia de vibración al número de veces que los cuerpos oscilan en la unidad de tiempo y se expresa en Hz; la frecuencia de los US está por encima del límite perceptible por el oído humano. Los US se producen cuando una carga eléctrica atraviesa las superficies de algunos cristales (llamados piezoeléctricos y que tienen carga iónica de distribución asimétrica) y, por medio de la deformación ocasionada, el cristal produce una vibración que se propaga por el medio emitiendo una onda sonora. Estas ondas atravesarán el medio o serán rechazadas según la densidad acústica de éste. En caso de ser rechazadas, producirán un eco. Los cristales piezoeléctricos funcionan también a la inversa; emiten una carga eléctrica cuando se les somete a una vibración. Por ello, si el eco vuelve hacia los cristales piezoeléctricos, estos emitirán cargas eléctricas que, por medio de un oscilómetro y un ordenador, pueden ser convertidas en una imagen en dos dimensiones (Coatney 2001).

Los cristales utilizados inicialmente fueron el cuarzo y el sulfato de litio; hoy día, han sido sustituidos por cristales de cerámica sintética, titanato de bario y zirconato de zinc, que superan las cualidades de los anteriores, son más baratos y ofrecen mayor rendimiento. Estos cristales van montados en una sonda transductora con un mango de plástico para facilitar su manejo y evitar la dispersión de los US, y emiten en una banda de frecuencia determinada.

### **Tipos de sondas**

Las sondas transductoras pueden clasificarse por sufrecuencia, su tipo de emisión-recepción y la disposición de sus cristales.

- Frecuencia

La ecografía clínica convencional utiliza normalmente sondas entre 3,5-14MHz; la frecuencia es inversamente proporcional a la penetración en los tejidos; sondas de 3,5 MHz suelen utilizarse para exploraciones veterinarias en grandes animales, que necesitan profundidad; sondas de 5 MHz suelen utilizarse para exploraciones transtorácicas y

transabdominales en animales medianos y humana; sondas de 7,5 MHz y superiores se usan en exploraciones intracavitarias, en dermatología y oftalmología.

La tecnología de US ha avanzado tanto que, en la actualidad, existen equipos de ultrasonografía biomicroscópica o ultrasonografía de alta frecuencia (hasta 55 MHz) (Foster et al 2000. 2002; Zhou et al. 2004) que permiten visualizar estructuras a nivel microscópico, dando resoluciones similares a las obtenidas mediante cortes histológicos.

La profundidad de exploración está determinada por la frecuencia de la sonda, pero también por el tipo de tejidos explorados. El comportamiento del haz de US que envía la sonda depende de la resistencia de los tejidos a su paso. Esa resistencia característica de cada tejido es lo que se denomina densidad acústica o, más correctamente, **impedancia acústica**. En general, los US atraviesan fácilmente tejidos blandos y líquidos; no ocurre así en estructuras densas como huesos; o, por el contrario, en estructuras poco densas como el gas, con gran separación entre moléculas y en que los US no pueden pasar de una a otra (por ello, para evitar las interferencias que pueda ocasionar el aire existente entre el cuerpo y el transductor, se aplica una capa de gel entre transductor y piel). En los casos en que el US no puede atravesar la materia se produce un eco, que deberá ser de suficiente magnitud para regresar y ser detectado por los cristales, donde se convertirá en energía eléctrica. Las ligeras diferencias en la impedancia de tejidos contiguos se denominan **interfases** (Smith 1977) y el aparato de US o ecógrafo las representa según una escala de grises que va del negro al blanco. En negro, que se denomina patrón anecógeno o anecoico, se representan estructuras sin eco como el líquido; en blanco, que se denomina patrón hiperecóico o hiperecógeno, se representan estructuras que devuelven todos los US; entre ellos, está toda una escala de grises, más amplia cuanto mayor resolución tengan la sonda y el sistema.

La **Resolución** de una sonda es su capacidad para identificar y reconocer dos estructuras o interfases como tejidos diferentes; su valor es la distancia mínima que puede discernir entre dos puntos que corresponden a dos ecos diferentes. Se distinguen dos tipos de resoluciones:

**Resolución axial o profunda**, que es la capacidad de diferenciar dos objetos en una línea paralela al haz sónico.

**Resolución azimutal o lateral**, que es la capacidad de diferenciar dos objetos en una línea perpendicular al haz sónico.

El tamaño, forma y localización de las estructuras exploradas se calculan electrónicamente en base a la velocidad del sonido y el tiempo que éste necesita para ir y volver respecto a su velocidad. Cuando la distancia es grande, los ecos serán débiles por la absorción y dispersión sufridas; para contrarrestarlo, los equipos de *Tiempo Real* amplifican diferencialmente los ecos que retornan desde grandes distancias, a lo que se denomina **Compensación por Ganancia de Tiempo**, según el tiempo de retorno del eco para ofrecer una compensación de ganancia en profundidad por la pérdida de amplitud del eco al atravesar la materia. Esto da una resolución casi perfecta, pero en la que aún la nitidez de la imagen puede disminuir por artefactos que producen los ruidos y reverberaciones del parénquima (quistes y vasos sanguíneos), o por movimientos bruscos de la sonda; estos artefactos, que detallaremos posteriormente, se ven aumentados en sondas con mayor frecuencia o mayor compensación.

- Tipo de emisión-recepción

Las sondas pueden clasificarse, en segundo lugar, por su forma de emisión-recepción. Las sondas pueden actuar de forma **continua** (en emisión y recepción continuas) mediante dos cristales piezoeléctricos en que uno transmite mientras el otro recibe; o de forma **pulsátil** (alternando emisión y recepción) en que un sólo cristal envía cortas pulsaciones de US a intervalos regulares y entre dos de ellas recibe el retorno de los ecos. En realidad, la mayoría de las sondas no tienen sólo uno o dos cristales, pero el principio es el mismo.

- Disposición de los cristales

Las sondas, según la disposición de sus cristales, pueden ser **sectoriales**, cuando tienen únicamente un cristal emisor-receptor que *mecánicamente* y de *forma pulsátil* examina la región a explorar, y **lineales**, formadas por un conjunto de cristales piezoeléctricos alineados uno al lado del otro y que funcionan *electrónicamente* en *forma continua*. Las primeras requieren una superficie de contacto muy pequeña; las segundas, por tener un alto número de cristales que funcionan en forma continua e integran electrónicamente los ecos, proporcionan mayor calidad de imagen. Por ello, se ha diseñado un tercer tipo de sondas, **anulares**, que integran un alto número de cristales en un pequeño espacio.

En general, las sondas convencionales entre 3,5 y 14MHz utilizan sondas electrónicas continuas con diferentes disposiciones de los cristales; las sondas de ultrasonografía biomicroscópica, con una menor evolución tecnológica, utilizan sondas mecánicas pulsátiles sectoriales.

### Artefactos

La calidad de imagen y su fiabilidad se encuentran afectadas por la aparición de artefactos en la visualización de las estructuras (Pierson et al. 1988c); un artefacto es una imagen ultrasónica que no se corresponde con el eco real del tejido sometido a observación. Se deben tanto a causas técnicas como a causas derivadas de la interacción entre el ultrasonido y la materia sobre la que incide (Park et al. 1981).

- Artefactos por causas técnicas

Entre ellos, destaca el *ángulo de incidencia anormal*, que se produce especialmente en bordes de órganos que no están próximos a la perpendicular del haz de US; en estas zonas, se produce una omisión del eco y las estructuras aparecen incompletas. El problema se soluciona simplemente variando los ángulos de observación. Un mal contacto del transductor con la piel produce *el desplazamiento del eco* aunque también puede ocasionarlo movimientos del transductor o el animal, apareciendo líneas rectas discontinuas en la imagen. La *ganancia inapropiada* se ocasiona al realizar observaciones con ganancia muy alta que producen distorsiones en la imagen de los tejidos, mayores cuanto más cerca de la piel. Las *interferencias* se producen por el propio aparato (ruidos electrónicos), o por otros aparatos cercanos, por ejemplo al funcionar junto con un electrocauterio.

- Artefactos por causas derivadas de la interacción entre el ultrasonido y la materia

El principal es la *reverberación* o pulso de sonido que rebota entre dos interfases altamente reflectantes como son el gas o el hueso, y que se produce cuando se utiliza una ganancia tan alta que da lugar a líneas paralelas y ecos difusos. Los "*Herbies*" o *anillos concéntricos* son una variación del anterior que aparece en órganos dinámicos como el corazón, produciendo un efecto de aleteo en la imagen en movimiento y un objeto borroso al congelar la imagen. La *sombra acústica* se debe a una reflexión o atenuación completa de los ecos por estructuras como huesos, cálculos o gas, que impiden ver por debajo de

ellas al crear una zona *anecoica* artificial. Las *zonas de reflexión y refracción* ocurren en los márgenes de estructuras redondas que contienen material de velocidad acústica reducida, como estructuras quísticas con fluido, dando así una zona anecógena lineal. La *transmisión directa* está causada por una falta de atenuación de los ecos en estructuras con líquido, como ocurre en la vejiga de la orina o grandes folículos ováricos; se traduce en un área de ecos brillantes y densos, debido a que muchas ondas de sonido están presentes en esta zona en comparación con otras que están a la misma profundidad pero no por debajo de líquido.

### Seguridad biológica de los ultrasonidos

En cuanto que irradiación energética que pudiera afectar a células y tejidos, los US pueden ser eventualmente problemáticos como método de diagnóstico; para evaluar sus efectos sobre los tejidos biológicos deben tenerse en cuenta la intensidad máxima del haz, su frecuencia, el ciclo de servicio y el tiempo total de irradiación. En un diagnóstico standard, ni la intensidad es suficientemente alta ni la frecuencia es bastante baja para producir efectos nocivos; actualmente, el US es un método seguro a intensidades menores de 100 mW/seg cm, siendo la utilizada como standard entre 1 y 50; respecto a la frecuencia, se utilizan rangos mínimos de 1 MHz, mientras que los efectos nocivos aparecerían con unidades de kHz.

Los mecanismos de los efectos nocivos fueron ampliamente estudiados en las décadas de los años 70 y 80. Entre ellos destacan (Brown 1975), el *Efecto Temperatura*, producido por intensidades muy altas (250 W/cm) en ciclos de servicio prolongados, que se relaciona con un aumento importante de la temperatura; este efecto no es homogéneo, sino mayor en las interfases. El aumento de la temperatura influye sobre la actividad enzimática, provoca la desnaturalización de las proteínas y puede llegar a romper la membrana celular, liberándose los enzimas intracelulares a la corriente sanguínea. La *Cavitación*, o *Efecto Mecánico*, es la producción y conducción dinámica de las burbujas que existen en un medio irradiado con ultrasonidos a intensidades muy altas o frecuencias bajas; se divide en cavitación estable, en la que las burbujas persisten, y cavitación transitoria, en la que aumentan de tamaño hasta colapsarse y liberar gran cantidad de energía en forma de choques de ondas. El *Efecto Remolino (Shearing action)* sólo se ha producido *in vitro*; en él, la acción de las ondas de US produce remolinos, originando tensiones sobre las células. El *Movimiento Intracelular* se da también en forma de remolinos, pero dentro de la célula debido a las vibraciones de la membrana celular por los US.

Posteriormente se descubrieron **efectos de tipo químico** (Legrand y Carlier 1981), como formación de peróxidos y rotura de macromoléculas citoplasmáticas y nucleares. Los efectos químicos se relacionan también con altas intensidades no utilizadas en ecografía; por ello, estos autores concluyeron que el régimen ultrasónico utilizado a nivel clínico no es factible de producir el riesgo necesario para los fenómenos histotóxicos.

Los efectos que pudiera producir la observación ecográfica continuada sobre el aparato genital han sido estudiados principalmente en hembras gestantes, con referencia al desarrollo embrionario y fetal. En 1982, el American Institute of Ultrasound Medicine elaboró un estudio con frecuencias de 0,5 a 10 MHz, intensidades inferiores a 100 mW/cm y tiempos de exposición entre 1 y 500 segundos, sin encontrar alteraciones sobre los embriones o fetos (Kremkau, 1984); lo que coincide con otros autores (Hellman et al. 1970; Stapff y Zoller 1989; Brent, 1983, 1986, 1989). Por otro lado, existen autores que encuentran daños poco relevantes en el embrión con observaciones en condiciones extremas (Barnett, 1983; Atkinson et al. 1990; Barnett y Williams 1990; Norton et al. 1990).

En estudios recientes (Abramowicz et al. 2008) se ha visto como la utilización de ultrasonidos desprende calor, pudiendo aumentar hasta un grado la temperatura fisiológica del animal, por *Efecto Mecánico*. Este incremento afectaría negativamente a los fetos, principalmente en estudios cerebrales; además, no se descarta la posibilidad de que a partir del aumento de temperatura se generen otros efectos no mecánicos, como puede ser alguna reacción química iniciada por el oxígeno libre (Stratmeyer et al. 2008). Sin embargo, estos efectos no han sido detectados en estudios epidemiológicos realizados en humanos; esto se debe a que se relacionan con la intensidad por centímetro cuadrado de exploración, que desde el año 1992 no se permite que exceda los 720 mW/cm<sup>2</sup> y que en los aparatos comerciales no supera los 94 mW/cm<sup>2</sup> (Abramowicz et al. 2008). Pero, además, la breve duración de los exámenes evita el riesgo de alteraciones en el desarrollo embrionario, que sólo se han descrito con exposiciones mayores a 30 minutos y frecuencias inferiores a 3,5 MHz (Rao et al. 2006).

#### *Posibilidades del diagnóstico y seguimiento de gestación por US en ratón*

En resumen, la técnica de US se basa en la exposición de parte del cuerpo a ondas acústicas de alta frecuencia para producir imágenes del interior del organismo, moviendo simplemente el transductor sobre el área de la piel que se encuentra sobre la parte del cuerpo a examinar. Las imágenes por US pueden mostrar la estructura y el



movimiento de los órganos internos del cuerpo; pero, además, se capturan en tiempo real, lo que permite detectar movimientos de órganos como el corazón o la sangre que fluye por los vasos sanguíneos. Pero, además, esta imagen es susceptible de un gran desarrollo futuro. En primer lugar, puede combinarse con efecto Doppler; lo que permite valorar el movimiento y el flujo de esas estructuras. En segundo lugar, la imagen puede mejorarse mediante el uso de sustancias de contraste; que consisten en microburbujas estabilizadas, de gas o sustancias opacas a los US, que presentan un fenómeno de resonancia al ser insonadas e incrementan la señal que recibe el transductor.

Por todo ello, la ecografía clínica convencional es un procedimiento sencillo, en el que no se emplea métodos invasivos ni radiación y en que las observaciones se realizan *in vivo* y en tiempo real; debido a esto, es la técnica por excelencia que se usa para visualizar estructuras gestacionales en humana y muchas especies animales. En base a estas consideraciones, fue la técnica elegida para desarrollar los estudios de diagnóstico y seguimiento de la gestación en ratón de esta Memoria de Tesis. Nuestra hipótesis se vio reforzada por la publicación, durante el desarrollo de los trabajos experimentales, por la publicación de dos trabajos que utilizaban ultrasonografía convencional para el diagnóstico de gestación en ratón (Brown et al. 2006; Russo et al. 2007).





### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.



## ANIMALES

En este trabajo se han empleado un total de 141 hembras de tres de las líneas más frecuentemente utilizadas en investigación (BALB/c, C57BL/6J y CD1), en edad reproductiva de entre 6-9 semanas de edad y en condiciones sanitarias saludables.

Todos los animales destinados a este estudio se alojaban en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC); centro autorizado por el Ministerio de Agricultura para la utilización de animales con fines científicos.

En estas instalaciones, el ciclo de luz (fotoperiodo) es artificial, con 12 horas de luz (7:00-19:00 horas) y 12 horas de oscuridad. Las condiciones de humedad (50-60%) y temperatura (20-21°C) se han mantenido constantes y reguladas por mecanismos informáticos. De esta forma, podemos ratificar que los experimentos son reproducibles y no existen factores ambientales que modifiquen los resultados. Los animales se alojaron en jaulas de makrolón con tapa de filtro (Tecniplast, Casale Litta, Italia), en grupos siguiendo la normativa vigente de animal/cm<sup>2</sup>, y en el interior se colocaron objetos que suscitan el enriquecimiento ambiental y fomentan el desarrollo instintivo del ratón, como la fabricación de nidos antes del parto o túneles donde esconderse. La alimentación se administra "ad libitum" con comida especial para cría y reproducción, esterilizada por irradiación (Global Diet 2018, Harlan, Blackthorn, Reino Unido) y bebida previamente autoclavada.

Todos los experimentos realizados en este estudio se sometieron a la evaluación del comité ético en bienestar animal del Instituto Carlos III y se aceptaron bajo licencia 156/07 y siguiendo la normativa española RD 1201/05 y la Directiva de la Unión Europea 86/609 sobre protección en el uso de animal de experimentación.

## MANEJO DE LOS ANIMALES

Para la gestación de las hembras utilizadas en el desarrollo experimental se utilizó la monta natural, pero la inducción del celo se realizó con dos métodos diferentes:

En los experimentos 1, 2, y 4, se obtuvo el celo espontáneo mediante la introducción de los machos en una proporción de una hembra por cada macho; en los experimentos 3 y 5, el celo y la ovulación se obtuvieron mediante un tratamiento de sincronización de celo y ovulación diseñado y patentado en nuestros laboratorios (número de patente P-200702376), como se detalla en el Anexo 2. En breve, este tratamiento consiste en la administración, en el Día -3, de una inyección intraperitoneal de 0,5 µg de un análogo de prostaglandina (Cloprostenol, Estrumate®, Mallinckrodt Vet. GMBH, Friesoythe, Alemania), combinada con una dosis subcutánea de 3 µg de progesterona (4- pregnen-3,20-diona, Siemsgluss Iberica, Barcelona, España) disuelta en solución salina. En el Día 0, las hembras se tratan con una segunda inyección intraperitoneal de 0,5 µg de cloprostenol e inmediatamente se introdujeron en la jaula del macho.

El macho se individualiza para que disminuya el efecto de jerarquización y la espermatogénesis sea correcta. Posteriormente, se seleccionan aquellos machos que hayan demostrado su fertilidad en otros cruces. En todos los estudios, el día de introducción del macho se consideró Día 0 a efectos experimentales, y en el día siguiente, se llevaba a cabo la visualización del tapón vaginal (alrededor de las 08:00 horas); momento considerado como el Día 0,5 pc. La interpretación de 0,5 es debida a la particularidad murina de poseer hábitos nocturnos; así, se estima que tanto el celo como la monta se producen en el periodo de oscuridad y que al visualizar el tapón habrán transcurrido aproximadamente 12 horas (0,5 días) desde entonces.

Los estudios realizados por Theiler demuestran que pueden existir cambios en la morfología del embrión/feto en el transcurso de pocas horas y en cualquier estadio de su desarrollo. Asumiendo por tanto esas posibles diferencias, los estudios se han realizado exclusivamente durante la mañana, y se especifica el momento visualizado anotando el día seguido de "punto 5".

## **EQUIPOS DE ULTRASONOGRAFIA**

Las observaciones ultrasonográficas se realizaron con 4 aparatos diferentes de ultrasonidos.

En los 4 primeros estudios, se utilizó ultrasonografía convencional; puesto que la resolución y calidad de la imagen obtenida depende del transductor utilizado (disposición de los cristales piezoeléctricos y frecuencia de emisión), se compararon

diferentes equipos. Así, se utilizaron un Aloka 500 SSD (Aloka Co., Tokio, Japón) equipado con una sonda lineal de 7,5 MHz, un Aloka 2500 con una sonda sectorial multifrecuencia (7,5-10 MHz) y un Siemens Acuson Antares con una sonda lineal multifrecuencia (7,5-10 MHz; Siemens Medial Solution, Earlangen, Alemania).

En el quinto experimento se utilizó un equipo Vevo 770 (Visual Sonics Inc, Toronto, Canadá) equipado con una sonda lineal de 40 MHz. Esta sonda permite una resolución de 30–50  $\mu\text{m}$ , cercana a la histología convencional.

### *METODOLOGÍA DE EXPLORACIÓN ULTRASONOGRÁFICA*

En los estudios ultrasonográficos convencionales, realizados en los primeros cuatro experimentos, las hembras se dividieron en dos grupos experimentales iguales que se observaron en días alternos para evitar alteraciones que, simplemente por la manipulación, pudieran inducirse en la madre o en los fetos. Asimismo, no se utilizó anestesia, previniendo de esta forma cualquier efecto negativo en la gestación (Mazze et al. 1985), y se evitó la depilación abdominal, con el fin de disminuir el estrés y evitar pérdidas de calor que comprometiese la gestación. Sin embargo, la presencia de aire entre el pelaje del animal implica una disminución en la calidad de las imágenes; por ello, se aplicó una abundante cantidad de gel de ultrasonidos (carboximetilcelulosa) en el abdomen.

Inmediatamente, el análisis ultrasonográfico se realizaba colocando el transductor en la pared abdominal y moviéndolo en diferentes direcciones para visualizar los cuernos uterinos y su contenido. En el momento en que se detectaba la presencia de estructuras gestacionales, el número de embriones/fetos se cuantificaba posicionando el transductor, en planos transversales, frontales o sagitales, en un extremo del abdomen y desplazándolo hacia el lado opuesto para localizar, en su totalidad, los diferentes embriones y fetos. Las mediciones se llevaban a cabo manipulando la sonda hasta obtener la mayor sección de la estructura a medir; posteriormente se posicionaban los calipers de que están provistos los aparatos en los extremos de las estructuras. En realidad, para disminuir los tiempos de observación y el estrés originado, las imágenes se iban grabando y, tras liberar al animal, se utilizaron las grabaciones obtenidas. Para evitar efectos individuales derivados de la corpulencia de cada embrión o feto, se realizaron observaciones de un mínimo de tres crías diferentes.



En las observaciones por ultrasonografía biomicroscópica (UBM), y debido a la sensibilidad de la técnica, se precisa la anestesia para minimizar los movimientos del animal. Puesto que, finalmente, las ratonas se iban a sacrificar para realizar la validación de la técnica, se practicaba una anestesia inhalatoria (isoflurano). También se retiraba el pelo de la región abdominal y flancos, con una crema depilatoria, para mejorar la calidad de las imágenes obtenidas en el estudio.

#### *VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA*

La utilidad y precisión de la ultrasonografía convencional para el diagnóstico y seguimiento de la gestación temprana se validaron sobre animales en diferentes etapas de la gestación (Días 4,5, 8,5, 10,5, 12,5 y 14,5 pc) en que, tras realizar el estudio ecográfico, se obtuvieron los embriones tras anestesia de la madre con isoflurano y posterior sacrificio mediante dislocación cervical.

En el caso de la observación con UBM en el quinto experimento, se realizaba también un estudio comparativo con las imágenes macroscópicas. Al terminar cada sesión, las ratonas anestesiadas se sacrificaban humanitariamente por dislocación cervical y se realizaba una laparotomía para separar, retirar el útero y colocarlo en una placa de Petri que contenía PBS (Solución salina fosfatada). Inmediatamente después, al menos dos de los sacos gestacionales se retiraban y diseccionaban con pinzas para observarlos y fotografiarlos usando una lupa. En algunos estadios concretos se realizaba una comparativa con la imagen obtenida con RMN.





### **3.1. Objetivo 1. Utilidad de la ultrasonografía convencional para el estudio de la gestación en ratón**

El objetivo de este estudio fue determinar la precocidad y veracidad de la ultrasonografía para el diagnóstico y determinación del número de fetos (Experimento 1), y el seguimiento de los cambios fenotípicos durante el desarrollo embrionario en ratón (Experimento 2). Asimismo, se evaluó la utilidad de distintas sondas con diferentes disposiciones de los cristales piezoeléctricos (lineal o sectorial) y varias frecuencias de emisión (7,5 y 10 MHz). La posible influencia del background genético se valoró mediante comparación de tres de las líneas de ratón más utilizadas en los ensayos científicos (BALB/c; C57BL/6J y CD1).



### Experimento 1. Utilización de la ultrasonografía convencional para el diagnóstico precoz de gestación y la determinación del número de fetos en ratón

#### **Animales y toma de datos**

El estudio fue realizado sobre un total de 46 hembras adultas y gestantes, de las diferentes líneas consanguíneas y no consanguíneas más utilizadas en experimentación (19 BALB/c, 15 C57BL/6J y 12 CD1). La gestación se obtuvo mediante monta natural tras celo espontáneo; distribuyéndose los animales en grupos de 4-5 individuos según el día del tapón vaginal. En cada uno de ellos, desde el Día 3,5 pc (considerado día de la implantación; Kaufman 1989), se realizaba la observación ultrasonográfica de las estructuras gestacionales, como se ha descrito en el apartado de metodología; en días alternos para minimizar el manejo.

#### **Análisis de los datos**

Los datos obtenidos, respecto diagnóstico de gestación y número de crías, se agruparon conforme al día de gestación y fueron comparados con los datos obtenidos en días posteriores o en el momento del parto para, así, determinar la eficacia y el valor predictivo de la ultrasonografía.

La efectividad para la determinación del tamaño de la camada fue evaluada tanto para el número total de embriones como para diferentes rangos (menos de 5, entre 5-10 y más de 10 crías).

El valor predictivo de la ultrasonografía para el diagnóstico de la gestación y la determinación del tamaño de la camada se estableció en términos de sensibilidad (porcentaje de hembras diagnosticadas correctamente como gestantes y determinación correcta del número de crías) especificidad (porcentaje de hembras diagnosticadas correctamente como no gestantes y que no poseían embriones) y eficiencia total (porcentaje total de individuos correctamente clasificados como gestantes o no y porcentaje total de ratonas en que se determinó correctamente el número de crías).

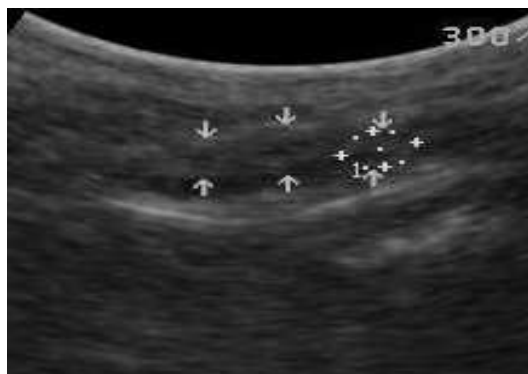
La relación entre valor predictivo y edad gestacional fue establecida mediante un análisis de correlación de Pearson; considerado estadísticamente significativo para  $P < 0,05$ .

## Resultados

El diagnóstico más precoz de gestación fue obtenido en el día 4,5 pc, por visualización del lugar de implantación, en tres ratonas diferentes, una de cada línea, que se correspondieron con la validación macroscópica (Figura 1.3) Esta observación fue realizada a una frecuencia de 10 MHz; tanto con transductores lineales como sectoriales (Figuras 1.1 y 1.2). La observación con las sondas de 7,5 MHz no fue posible, debido a la ausencia de líquido amniótico en la vesícula embrionaria; lo que dificultaba discernir las imágenes correspondientes a cuernos uterinos y contenido abdominal.



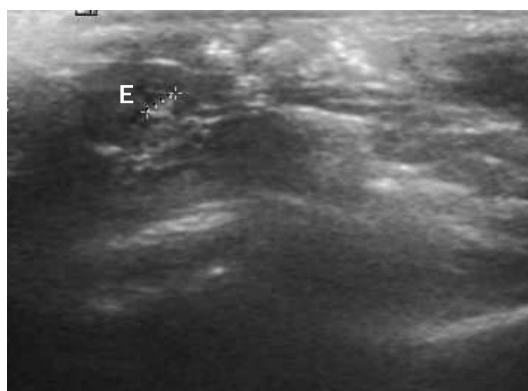
**Figura 1.1.** Vesícula embrionaria de hembra BALB/c a 4,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 1.2.** Vesículas embrionarias de hembra BALB/c a 4,5 pc con sonda sectorial de 10 MHz.



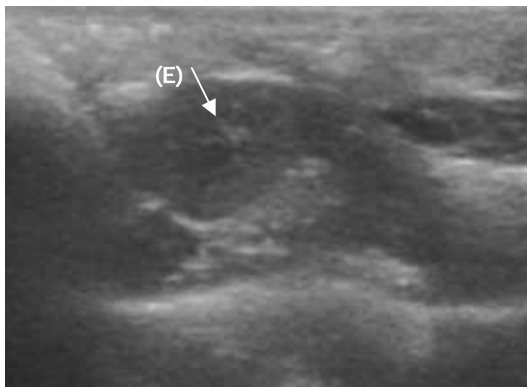
**Figura 1.3.** Validación de la imagen visualizada por ultrasonografía. Reacción decidual provocada por la implantación embrionaria (rodeada por círculo) en útero de hembra BALB/c a 4,5 pc.



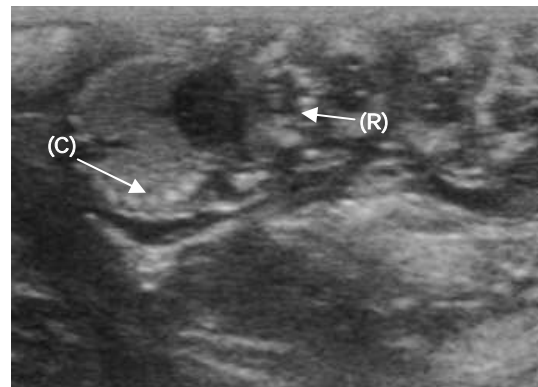
**Figura 1.4.** Vesícula embrionaria en hembra BALB/c a 5,5 pc con sonda lineal de 10 MHz. En el interior se visualiza el embrión (E) como una masa ecoica dentro de la vesícula que, por su contenido líquido, aparece anecoica.

En cualquier caso, el uso de transductores con 10 MHz de frecuencia permitió, en todos los animales, evidenciar la presencia de vesículas embrionarias, y embriones en su interior, desde el Día 5,5 de gestación (Figura 1.4).

El embrión y las estructuras gestacionales se distinguieron claramente a partir del Día 8,5 pc (Figura 1.5) que se correspondieron con la validación macroscópica (Figura 1.7) y, desde el Día 9,5 pc, conseguimos determinar su viabilidad, visualizando y cuantificando el latido cardiaco. En estadios mas avanzados de gestación fue posible diferenciar las características fenotípicas y estimar la normalidad o anormalidad en el desarrollo del feto (Figura 1.6).



**Figura 1.5.** Vesícula embrionaria y embrión (E) de hembra C57BL/6J a 8,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



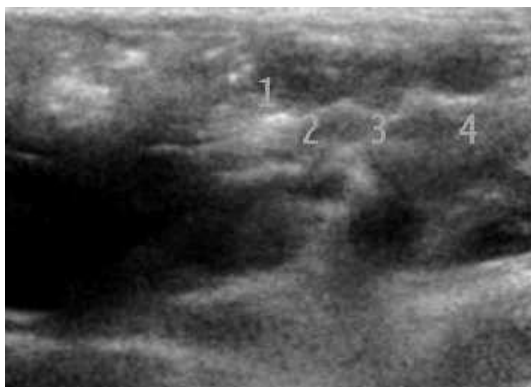
**Figura 1.6.** Embriones a término (17,5 pc) de hembra C57BL/6J con sonda lineal de 10 MHz. Se diferencia fácilmente cabeza-tronco, comienzo de osificación en rostro (R) y costillas (C).



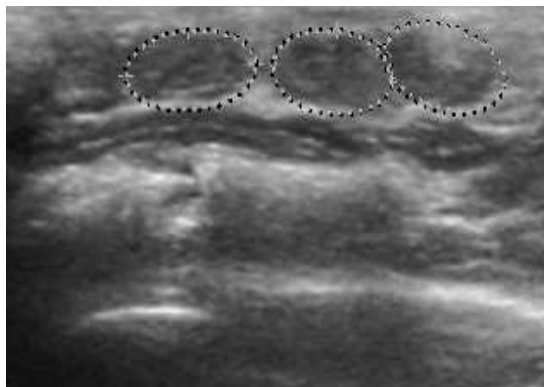
**Figura 1.7.** Validación de la técnica. Embrión de CD1 a 10,5 pc, extraído del útero y retirada la placenta.



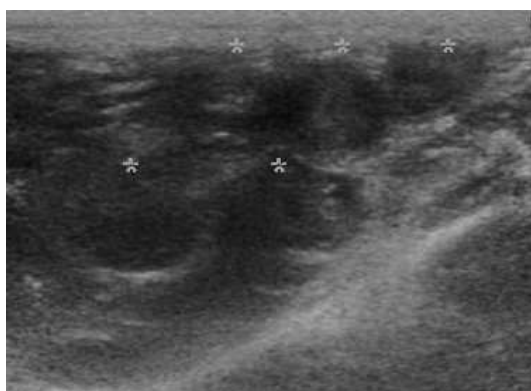
La determinación del número de embriones puede realizarse a partir del Día 6,5 pc; sin embargo, la eficiencia de este cómputo no es muy alta, produciéndose sobreestimación en hembras de alta prolificidad. La técnica ofrece una alta precisión, sensibilidad, especificidad y eficiencia total, alcanzando el 100% cuando la exploración se realiza a partir del Día 8.5 de gestación (Figuras 1.8 a 1.11).



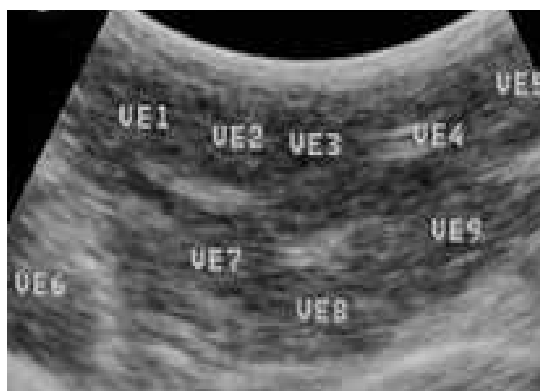
**Figura 1.8.** Embriones de hembra C57BL/6J a 6,5 pc con sonda lineal de 10 MHz. Es posible contabilizar las vesículas (1-4).



**Figura 1.9.** Embriones de hembra C57BL/6J a 8,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 1.10.** Embriones de hembra C57BL/6J a 10,5 pc con sonda lineal de 10 MHz. Vesículas marcadas (\*), se visualiza en el interior el embrión.



**Figura 1.11.** Vesículas numeradas del 1 al 9 de hembra C57BL/6J a 10,5pc con sonda sectorial de 10 MHz.

## Discusión

El estudio revela que la ultrasonografía abdominal se puede considerar como una técnica viable para el diagnóstico precoz de gestación en ratón. Este diagnóstico puede establecerse en el día siguiente a la implantación; es decir, la primera visualización eficaz de gestación en la que se observa específicamente el lugar de implantación se

consigue el Día 4,5 pc. Sin embargo, la mayor eficiencia (100%) se consigue desde el día siguiente, Día 5,5 pc, usando sondas de 10 MHz de frecuencia. La precocidad y fiabilidad de las observaciones fue limitada usando transductores de 7,5 MHz y también debe señalarse que se incrementa la calidad de la imagen utilizando sondas lineales.

Los resultados de este estudio muestran que la eficiencia de la ultrasonografía es, por tanto, mayor que la obtenida por palpación abdominal (Foster 1983); a ello debe unirse una mayor precocidad (el uso de la palpación es posible sólo desde los 12 días) y objetividad, puesto que la palpación depende de la habilidad del operador y el tamaño de las crías (Kaufman 1989).

La precocidad obtenida en el presente estudio es también mayor que la de estudios ultrasonográficos previos (7,5 días, Russo et al. 2007, y 9,5 días, Brown et al. 2006).

La eficiencia para la determinación del número de embriones fue adecuada cuando se evaluaba el rango (100% desde el Día 8,5 de gestación), pero muy baja para valorar el número exacto de embriones. En cualquier caso, la técnica ultrasonográfica es más fiable que la palpación y se puede considerar adecuada para el manejo de grandes grupos experimentales, teniendo en cuenta que no se precisa anestesia y no se depila al animal, favoreciendo de esta manera su bienestar. Además, el tiempo empleado para el examen fue siempre breve (4-5 minutos), lo que también contribuía a minimizar el estrés y evitaba posibles efectos negativos de los ultrasonidos sobre el crecimiento y desarrollo tanto pre- como post-natal; efectos que, por otra parte, sólo se han descrito con exposiciones mayores a 30 minutos y con frecuencias inferiores a 3.5 MHz (Rao et al. 2006).

En conclusión, la ultrasonografía puede ser utilizada como una técnica no invasiva, alternativa a la palpación abdominal, laparotomía y otras técnicas de imagen que necesiten anestesia, para el diagnóstico de gestación y determinación del número de fetos en ratón, desde estadios tempranos; reemplazando otros procedimientos usados e incrementado la eficiencia en el manejo del animal en investigación, acorde con las recomendaciones de las 3Rs de Russell y Burch.



## *Experimento 2. Caracterización por ultrasonografía convencional de los cambios fenotípicos durante el desarrollo embrionario en diferentes genotipos de ratón*

### **Animales y toma de datos**

El estudio fue realizado sobre un total de 34 hembras adultas y gestantes (9 BALB/c, 10 C57BL/6J y 15 CD1). La gestación se obtuvo mediante monta natural tras celo espontáneo; distribuyéndose los animales en grupos de 4-5 individuos según el día del tapón vaginal. De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio anterior, en cada uno de ellos se realizó la observación ultrasonográfica desde el Día 4,5 pc; en días alternos para minimizar el manejo

En cada observación se llevó a cabo la determinación de las estructuras y órganos embrionarios visualizables y se procedió a la toma de medidas como se ha descrito en el apartado de metodología.

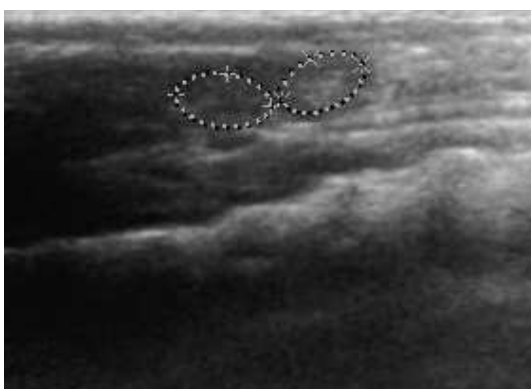
### **Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron agrupados por día de gestación y su tratamiento estadístico se realizó mediante análisis lineales y cuadráticos standard. Las curvas de regresión predictivas para cada variable fueron calculadas por el mejor ajuste de datos en base a su coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Los efectos del genotipo y el tamaño de la camada en la posible correlación entre el día de gestación y el tamaño del embrión o feto fueron valorados por un análisis de varianza para medidas repetidas (split-plot ANOVA). Los valores de los parámetros se expresan como media  $\pm$  E.S.M. y se aceptan como significativamente estadístico para  $P < 0,005$ .

### **Resultados**

La primera estructura visualizada fue el lugar de implantación, en el Día 4,5 pc; en ese día, fue ya posible obtener el tamaño del diámetro de la vesícula (Figura 2.1). En el día siguiente, 5,5 pc, puede diferenciarse nítidamente la forma correspondiente al embrión (Figura 2.2) y a Día 6,5 pc puede discernirse entre cabeza y tronco. Es posible

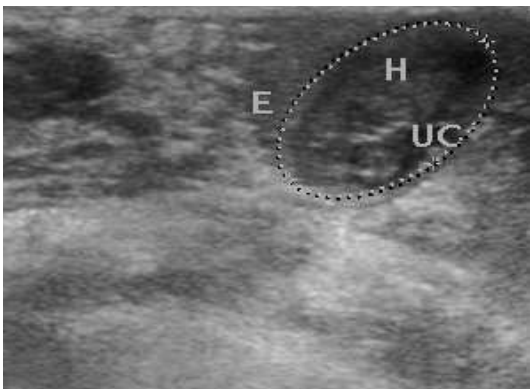
diferenciar y cuantificar el latido cardiaco desde el Día 10,5 pc (Figuras 2.5) visualizándose el embrión en detalle y distinguiéndose diferentes estructuras como corazón, cordón umbilical y placenta (Figuras 2.3 y 2.4). En el Día 14,5 pc, el feto se encuentra completamente formado y pueden reconocerse detalles de osificación en cabeza, vértebras, costillas y extremidades; así como la imagen de algunos órganos de las cavidades abdominal y torácica (Figuras 2.6 y 2.8). Incluso ha sido posible la visualización de la papila genital (Figura 2.7).



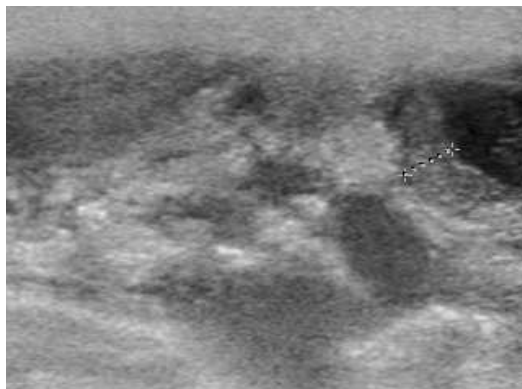
**Figura 2.1.** Primeras estructuras visualizadas durante la gestación. Vesículas embrionarias de hembra C57BL/6J a 4,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



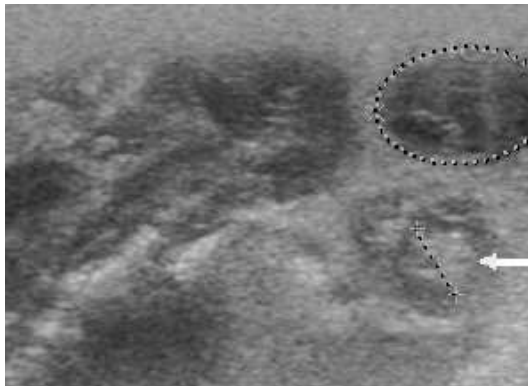
**Figura 2.2.** Diferenciación de embrión a 5,5 pc de hembra CD1 con sonda lineal de 10 MHz.



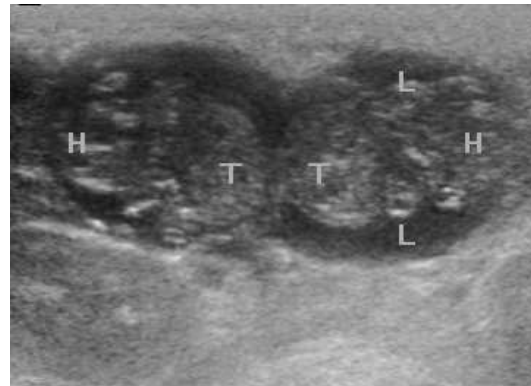
**Figura 2.3.** Corazón (H) y Cordón Umbilical (UC) de hembra C57BL/6J a 10,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



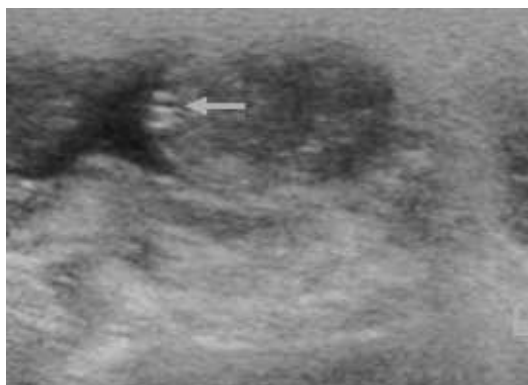
**Figura 2.4.** Grosor de la placenta en hembra BALB/c a 10,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.5.** Localización del latido cardíaco en hembra BALB/c a 10,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.6.** Diferenciación de cabeza (H) Torax (T) y extremidades (L) en hembra C57BL/6J a 14,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.7.** Diferenciación de papila genital (flecha) en hembra CD1 a 14,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



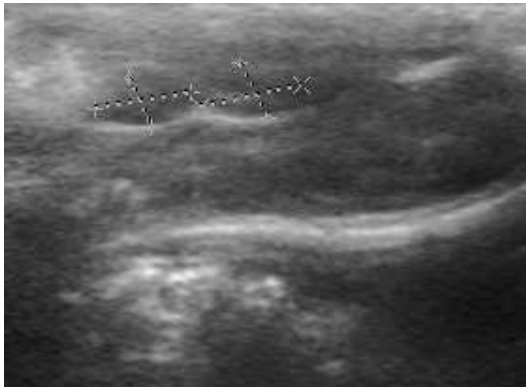
**Figura 2.8.** Diferenciación de hígado (L) Corazón (H) y costillas (R) en hembra C57BL/6J a 18,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.

Paralelamente a la observación de cambios fenotípicos durante la morfogénesis, la aplicación de la ultrasonografía permitió realizar valoraciones fotométricas. Las estructuras en las que fue posible realizar este estudio, se encuentran detalladas en la Tabla 2.1, en que se muestran las medidas obtenidas durante la preñez y se relacionan con la edad gestacional.

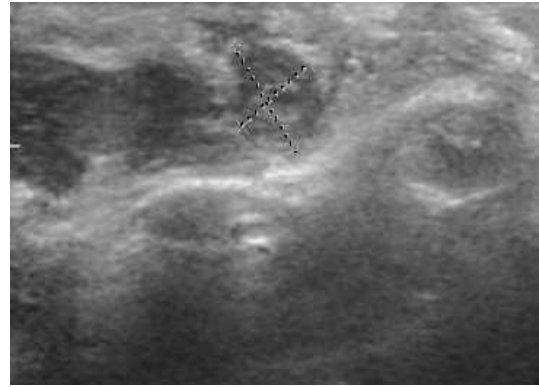
**Tabla 2.1.** Relación de las medidas del embrión tomadas por ultrasonografía con la edad gestacional. (Ecuación de regresión y valores  $r^2$ ) en tres líneas de ratón: BALB/c, C57BL/6J y CD1.

Medida	Tipo de Curva	Línea de ratón	Ecuación	$r^2$
Vesícula Embrionaria (diámetro longitudinal)	Exponencial	BALB/c	$y = 1,7873e^{0,1302x}$	0,902
		C57BL/6J	$y = 1,2493e^{0,1483x}$	0,856
		CD1	$y = 1,5585e^{0,1384x}$	0,761
Vesícula Embrionaria (diámetro transversal)	Exponencial	BALB/c	$y = 1,2625e^{0,1127x}$	0,872
		C57BL/6J	$y = 0,8401e^{0,1384x}$	0,843
		CD1	$y = 0,8507e^{0,1504x}$	0,811
Vesícula Embrionaria (Area total)	Exponencial	BALB/c	$y = 0,0235e^{0,2235x}$	0,827
		C57BL/6J	$y = 0,0077e^{0,2883x}$	0,849
		CD1	$y = 0,0133e^{0,2688x}$	0,797
Longitud craneo-caudal	Exponencial	BALB/c	$y = 0,5198e^{0,1966x}$	0,882
		C57BL/6J	$y = 0,7347e^{0,1802x}$	0,857
		CD1	$y = 0,8401e^{0,1714x}$	0,863
Diámetro del tronco	Exponencial	BALB/c	$y = 0,9413e^{0,1072x}$	0,785
		C57BL/6J	$y = 0,9836e^{0,1124x}$	0,552
		CD1	$y = 0,5875e^{0,1471x}$	0,859
Longitud occipito-nasal	Potencial	BALB/c	$y = 0,0079x^{2,2694}$	0,602
		C57BL/6J	$y = 0,0058x^{2,4059}$	0,831
		CD1	$y = 0,0169x^{2,0052}$	0,797
Diámetro biparietal	Potencial	BALB/c	$y = 0,0032x^{2,6841}$	0,758
		C57BL/6J	$y = 0,0017x^{3,0012}$	0,830
		CD1	$y = 0,0071x^{2,4742}$	0,803

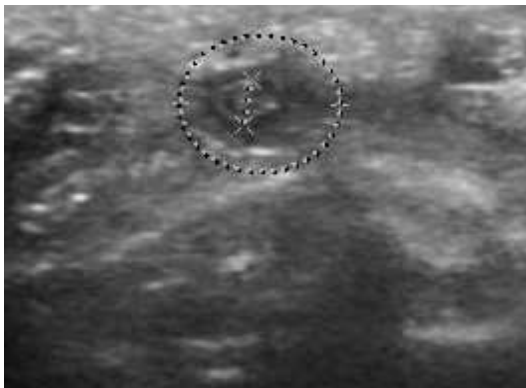
Las primeras medidas que se obtuvieron, desde el Día 4,5 pc, fueron el diámetro longitudinal y transversal (Figuras 2.9 y 2.10) y el área total de la vesícula embrionaria (Figura 2.11 y 2.12; Gráfica 2.1).



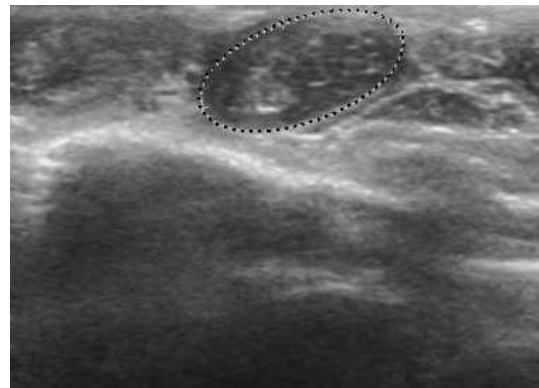
**Figura 2.9.** Diámetro longitudinal y transversal en vesículas de hembra CD1 a 4,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.10.** Diámetro longitudinal y transversal en vesículas de hembra C57BL/6J a 6,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



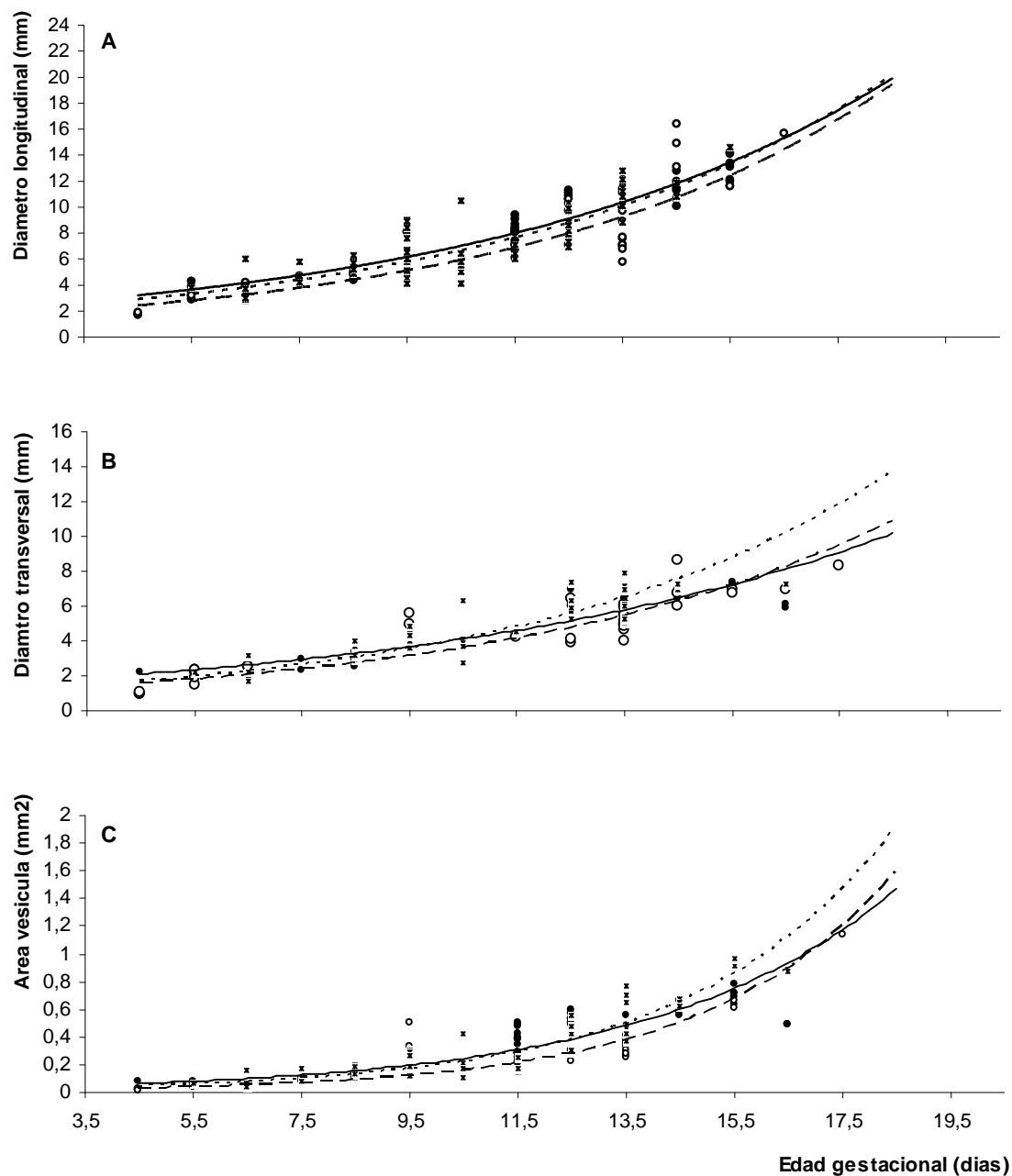
**Figura 2.11.** Área de la vesícula y diámetro transversal del embrión BABL/c a 8,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.12.** Área de la vesícula en hembra CD1 a 9,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.

Los valores de estas mediciones crecieron de forma exponencial durante la gestación, estando altamente correlacionadas con la edad gestacional ( $r^2= 0,820$  para la sección longitudinal,  $r^2= 0,746$  para la sección transversal y  $r^2= 0,743$  para el área;  $P<0,0005$  en todos los casos).





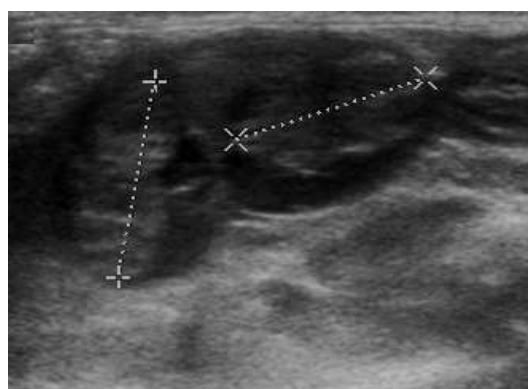
**Grafica 2.1.** Diámetro longitudinal de la vesícula (A). Diámetro transversal de la vesícula (B) y área total de la vesícula (C) en hembras BALB/c (círculos negros y línea continua), C57BL/6J (círculos blancos y línea discontinua) y CD1 (asteriscos y línea de puntos).

La comparación entre líneas no mostró diferencias significativas en las medidas tomadas en la sección longitudinal; sin embargo, los valores del diámetro transversal y el área total de la vesícula embrionaria fueron significativamente mayores ( $P < 0,05$ ), desde el Día 13,5 de gestación, en fetos de la línea CD1.

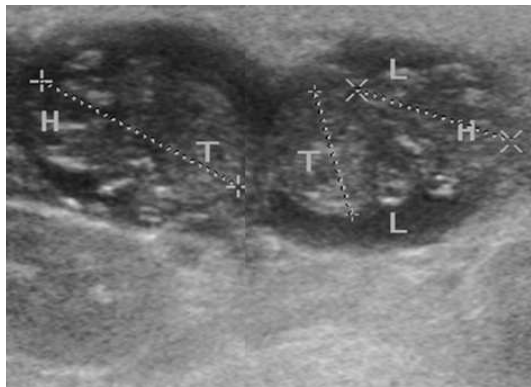
La precoz identificación del embrión a Día 5,5 de gestación permitió la adquisición de las medidas correspondientes a la longitud cráneo-caudal, el diámetro del tronco y el área corporal de los embriones y fetos desde ese día hasta el Día 18,5 pc, en fechas inmediatamente anteriores al parto (Figuras 2.13, 2.14 y 2.15); correspondiéndose con la validación macroscópica (Figura 2.16).



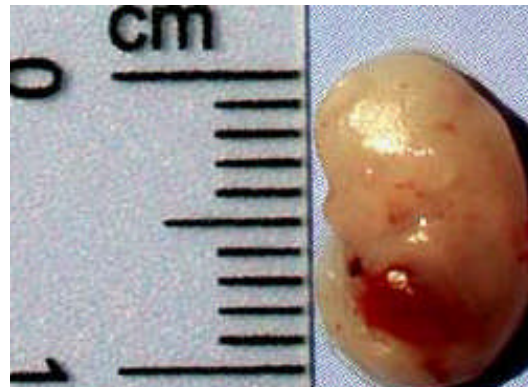
**Figura 2.13.** Diámetro total de embrión en hembra CD1 a 5,5 pc con lineal de 10 MHz.



**Figura 2.14.** Longitud cráneo-caudal de embrión en hembra C57BL/6J a 11,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



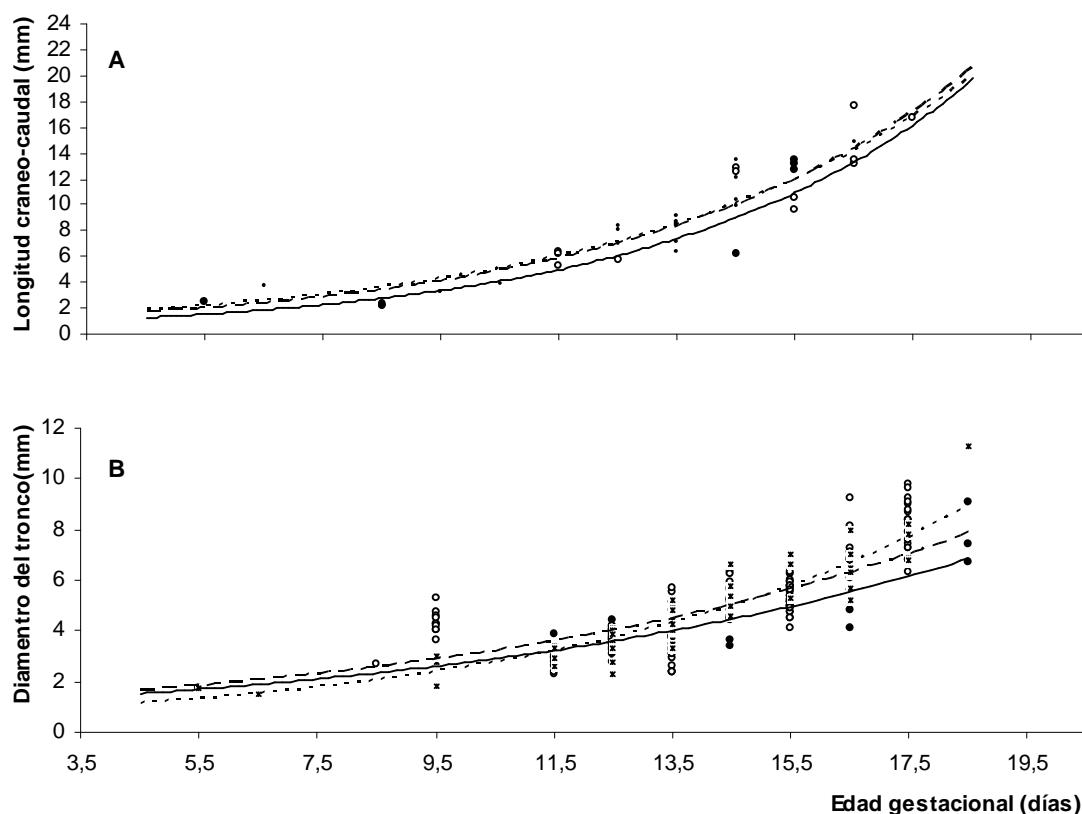
**Figura 2.15.** Longitud cráneo-caudal en el embrión de la izquierda y diámetro del tronco (T) y longitud occipitonasal en el embrión de la derecha; hembra C57BL/6J a 14,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.



**Figura 2.16.** Validación de la técnica. Embrión de hembra C57BL/6J a 14,5 pc.

Estos parámetros aumentaron exponencialmente durante el desarrollo de la gestación ( $r^2= 0,828$  para la longitud cráneo-caudal,  $r^2= 0,874$  para el diámetro del tronco y  $r^2= 0,784$  para el área del tronco;  $P<0,0005$  para todos ellos). En el estudio comparativo de los diferentes genotipos, no se encontraron diferencias significativas en las dos primeras semanas de gestación; sin embargo, el tamaño de los embriones fue diferente durante la última semana de gestación (último tercio). Así, en los embriones BALB/c, la

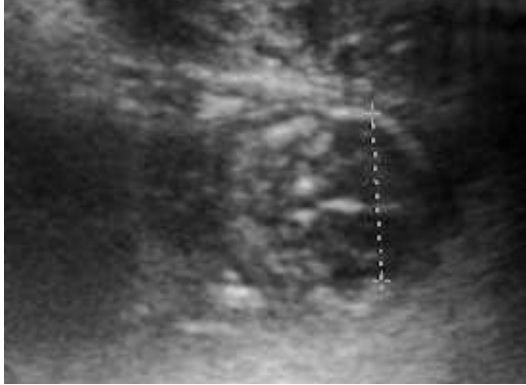
longitud cráneo-caudal fue algo menor que en las otras dos líneas y significativamente menor cuando se consideraba el diámetro y área del tronco ( $P < 0,005$ ). La valoración de las medidas del tronco mostró que los embriones CD1 son más anchos que los embriones C57BL/6J y estos son más corpulentos que los embriones BALB/c (Gráfica 2.2)



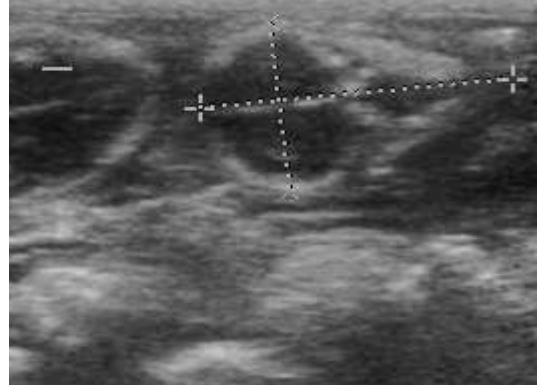
**Gráfica 2.2.** Curva de regresión que muestra la relación entre la longitud cráneo-caudal del embrión **(A)** y diámetro del tronco **(B)** con la edad gestacional en ratones BALB/c (Círculos negros y línea continua), C57BL/6J (Círculos blancos y línea discontinua) y CD1 (asteriscos y línea de puntos).

En estadios de gestación más avanzados, debido a la posición en "C" de los fetos, resultaba más difícil obtener la longitud cráneo-caudal. Por este motivo, se utilizaron otras determinaciones, aceptadas en otras especies, como el diámetro occipito-nasal y el diámetro biparietal (Figuras 2.17 y 2.18). Ambas medidas resultaron fáciles de caracterizar y mostraron una alta correlación con la edad gestacional. ( $r^2=0,763$  para la longitud occipito-nasal y  $r^2=0,765$  para el diámetro biparietal;  $P < 0,0005$  para ambos). De nuevo, no se apreciaron diferencias entre líneas en el principio de las mediciones; sin embargo, durante la última semana de gestación, las medidas de los embriones BALB/c fueron menores ( $P < 0,05$  para la longitud occipito-nasal) que para las otras dos

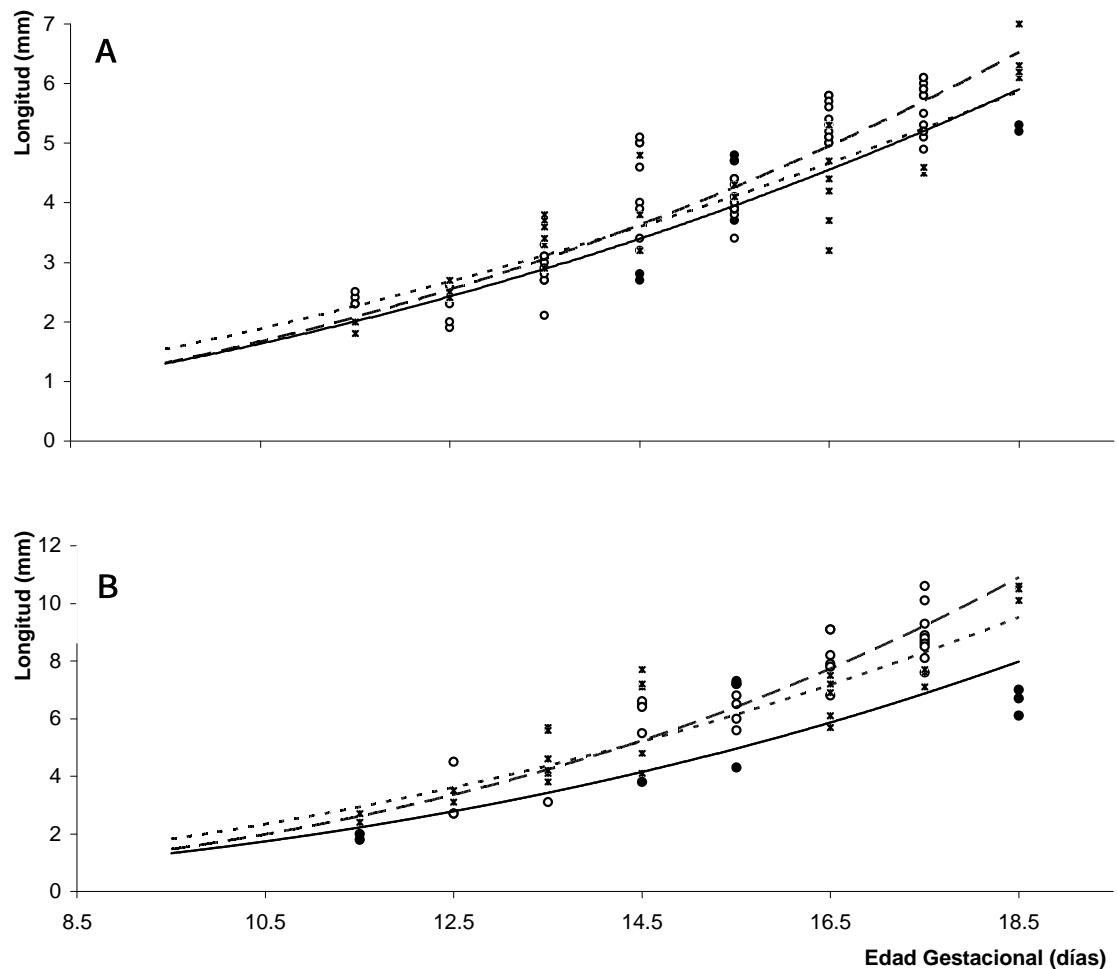
líneas. Sin embargo, y a pesar del menor tamaño corporal, las dimensiones de la cabeza fueron mayores en C57BL/6J que en CD1 ( $P < 0,005$ ; Gráfica 2.3).



**Figura 2.17.** Diámetro biparietal BALB/c a 14,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.

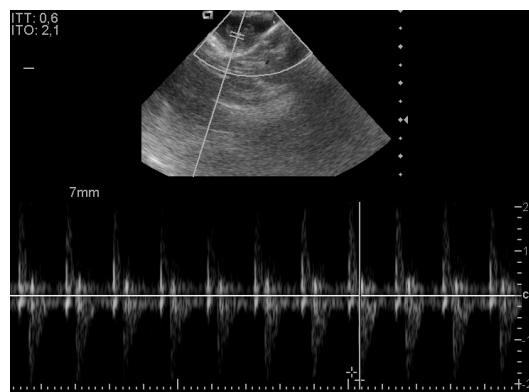


**Figura 2.18.** Diámetro biparietal (1) y Diámetro occipitonasal(2) en hembra C57BL/6J a 14,5 pc con sonda lineal de 10 MHz.

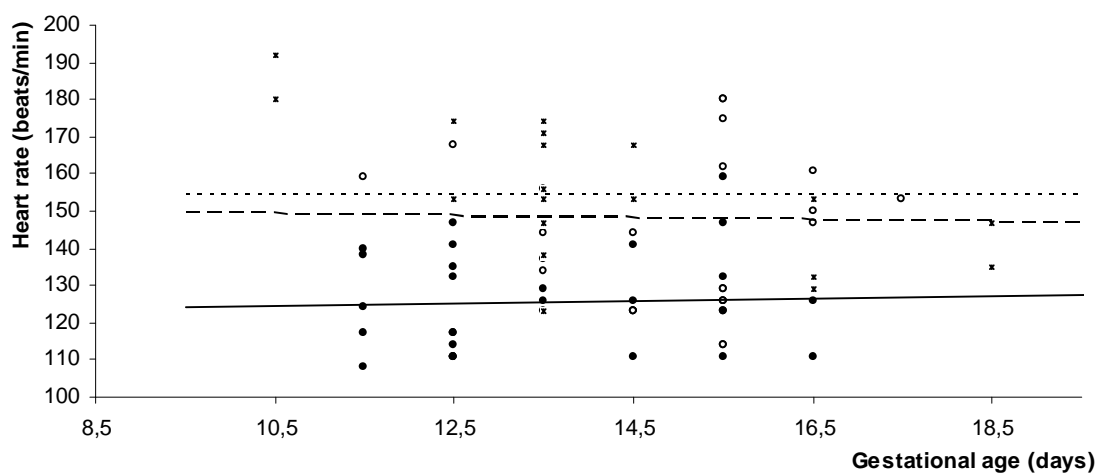


**Gráfica 2.3.** Curva de regresión que muestra la relación de la longitud occipitonasal del embrión (A) y diámetro biparietal (B) con la edad gestacional en ratones BALB/c (círculos negros y línea continua), C57BL/6J (círculos blancos y línea discontinua) y CD1 (asteriscos y línea de puntos).

Otras estructuras anatómicas que pudieron ser medidas fueron los diámetros de la órbita y del cordón umbilical y la longitud del fémur; sin embargo, las mediciones variaban considerablemente dependiendo de la posición del feto. Los anexos placentarios fueron claramente distinguibles y susceptibles de ser medidos desde el Día 12,5 de gestación (figura 2.4), con un grosor de  $1,5 \pm 0,2$  mm hasta el Día 18,5 ( $2,8 \pm 0,3$  mm), sin diferencias entre las líneas. El latido cardiaco pudo determinarse desde la primera visualización del primordio cardiaco a Día 10,5 pc y se mantuvo estable durante toda la gestación, lo que permite el seguimiento de la actividad cardiaca y de los grandes vasos sanguíneos (Figura 2.19). En el presente estudio, observamos una influencia significativa del background genético sobre la frecuencia cardiaca de los distintos embriones (Gráfica 2.4). En el caso del background CD1 y C57BL/6J, el número de latidos por minuto es similar ( $154,5 \pm 2,8$  vs  $147,8 \pm 4,5$ , respectivamente), mientras que en BALB/c la frecuencia fue menor ( $127,0 \pm 2,1$ ;  $P < 0,005$ ).



**Figura 2.19.** Latido cardiaco a 10,5pc en embrión CD1; Doppler con sonda lineal de 10 MHz.



**Gráfica 2.4.** Representación de la frecuencia cardiaca durante la gestación en ratones BALB/c (círculos negros y línea continua), C57BL/6J (círculos blancos y línea discontinua) y CD1 (asteriscos y línea de puntos).

## Discusión

Los resultados de nuestro estudio muestran que los ultrasonidos con sondas lineales de 10 MHz ofrecen una gran utilidad para valorar la viabilidad embrionaria y los procesos morfogénéticos y llevar a cabo mediciones del desarrollo embrionario desde estadios tempranos (Día 4,5 pc) de la gestación del ratón. Este es, para nuestro conocimiento, el primer estudio ultrasonográfico seriado de la visualización y medidas de las diferentes estructuras desde el periodo periimplantacional en ratón, ya que los trabajos de Brown et al. 2006 y Russo et al. 2007 comienzan a Día 7,5 y 9,5 pc, respectivamente.

Este trabajo ofrece también, como ventaja adicional para el uso de ultrasonidos, que el examen y adquisición de medidas puede realizarse de forma fácil y rápida, sin necesidad de anestesia o depilación abdominal; es decir, en condiciones excelentes para el bienestar animal y compatibles con la realización seriada de ultrasonografías durante varios días consecutivos. El uso de anestesia, descrita en los artículos citados previamente, limita la repetibilidad del estudio por las posibles consecuencias negativas para la madre y sus fetos (Mazze et al. 1985). A su vez, el uso de anestesia, incluso en una única sesión, puede alterar el estudio de algunas características fetales, como es el caso del ritmo cardíaco. Por otro lado, el breve tiempo empleado para el examen de ultrasonidos evita la inducción de posibles efectos negativos en el crecimiento y desarrollo pre y post-natales; aunque hemos de señalar de nuevo que estos efectos sólo han sido descritos con exposiciones mayores a 30 minutos y bajo frecuencias de emisión menores de 3,5 MHz (Rao et al. 2006).

Las observaciones y medidas realizadas en el presente trabajo confirman la aptitud de los ultrasonidos para los estudios de morfogénesis en ratón, por la precocidad al obtener los primeros datos y por la fidelidad de los resultados; además, la estimación de la edad gestacional es más exacta en las gestaciones tempranas. A partir de estudios realizados en otras especies, se sabe que los valores obtenidos en gestación más tardía se ven muy afectados por el tamaño de la camada y por las características individuales de cada feto; que es atribuible principalmente a características genéticas (Stephenson et al. 1960) y factores nutricionales (Richardson et al. 1976) que afectan al peso del feto, pero no a su longitud y desarrollo (Wenham 1981a,b). Estas consideraciones son también válidas para el ratón, teniendo en cuenta que, en este estudio, las diferencias de corpulencia entre las líneas y entre individuos de la misma línea comenzaron a establecerse desde el Día 10,5-11,5 de gestación.

Entre las medidas obtenidas, aquellas más sencillas de conseguir y de mayor correlación con la edad gestacional fueron el diámetro de la vesícula, la longitud cráneo-caudal, el diámetro del tronco, la longitud occipito-nasal y el diámetro biparietal.

El diámetro del saco gestacional en este estudio se encontró altamente correlacionado con la edad gestacional; en coincidencia con estudios anteriores con sondas de alta resolución (15 MHz; Brown et al. 2006).

La longitud cráneo-caudal y el diámetro biparietal presentan también una alta correlación con la edad gestacional. En concreto, la longitud cráneo-caudal es una medida usada frecuentemente en observaciones fetales post-mortem en las diferentes especies, ya que es considerado como uno de los parámetros más representativos (Evan y Sack 1973). Sin embargo, en estudios prenatales *in vivo* debe recordarse la posición en "C" de los embriones dentro del útero, que es una de las causas de subestimación en las medidas.

Otras medidas corporales, como es el caso del diámetro del tronco, están ampliamente reconocidas y aceptadas en otras especies por su alta correlación con la edad y el peso del feto (Kleeman et al. 1987). Sin embargo, tienen como factor limitante el encontrarse muy determinados por la corpulencia de los fetos, pudiendo inducir una alta variabilidad entre los diferentes individuos de la misma camada. La corpulencia, como se describe en el presente trabajo, está además determinada significativamente por la línea; resultando los fetos CD1 más grandes que los C57BL/6J y estos más corpulentos que los BALB/c. Estos resultados refuerzan nuestro criterio sobre la necesidad de establecer curvas de crecimiento como referencia en las diferentes líneas.

El cráneo es fácilmente reconocible por la hiperecogenicidad de los límites óseos que rodean los tejidos blandos; así, las medidas de la longitud occipito-nasal y el diámetro biparietal son fáciles de obtener. El hallazgo imprevisible ha sido comprobar que los valores craneanos son mayores en C57BL/6J que incluso en CD1, aun siendo ésta una línea más corpulenta. Este hallazgo puede estar relacionado con la mayor incidencia de distocias en esta línea encontrada en nuestro animalario y en otros centros (Xavier Cañas, Juan Martín e Isabel Blanco, comunicaciones personales).

Por último, el estudio comparativo de las diferentes líneas realizado en nuestro trabajo, ha permitido describir diferencias también en la frecuencia cardiaca entre los diferentes background genéticos estudiados. El número de latidos por minuto encontrado en los

embriones y fetos CD1 y C57BL/6J fue de entre 154-155; datos que coinciden con los descritos por Russo et al. (2006) en CD1. Sin embargo, la frecuencia cardíaca en BALB/c fue significativamente menor (alrededor de 127 latidos/minuto) Este hallazgo puede ser la base para futuros estudios en el desarrollo de ratón, pudiéndose valorar la actividad cardíaca mediante Doppler color y espectral y ultrasonografía en modo M (Spurney et al. 2006; Stypmann et al. 2007).

En conclusión, el uso de la ultrasonografía es adecuado para establecer la cronología de aparición y las medidas de diferentes órganos y estructuras embrionarias y fetales durante los distintos estadios de gestación en ratón. Por ello, su aplicación permite, de forma simple y no invasiva, la valoración de características fenotípicas, cambios en el desarrollo y malformaciones congénitas en fetos vivos. Las mediciones de la vesícula embrionaria, el diámetro biparietal y del tronco y la longitud occipito-nasal y cráneo-caudal resultan fáciles de realizar y son muy representativas del desarrollo de las crías. Por ello, este estudio establece las curvas de crecimiento de esas estructuras para las diferentes líneas utilizadas; datos que consideramos muy útiles para el manejo de la gestación en ratón, tanto con fines productivos como científicos.





### **3.2. Objetivo 2. Utilidad de la ultrasonografía convencional para la valoración de alteraciones en el desarrollo embrionario (retrasos en el crecimiento y/o mortalidad) en cepas con problemas reproductivos.**

En el desarrollo de este estudio se utilizaron como modelo las hembras de ratón *Nos3*-knock-out, en las cuales se han descrito trastornos reproductivos que conducen a una baja prolificidad, alta mortalidad embrionaria y alteraciones postnatales.

Esta línea es muy utilizada para estudios relacionados con la biología del óxido nítrico (NO), que es un agente mediador, y regulador, de numerosas funciones fisiológicas (Lowenstein et al. 1994). El NO es sintetizado por una familia de NO sintetasas (NOS) y posee tres isoformas: 1) *neuronal* (Tipo I, nNOS o NOS1), 2) *inducible* (tipo II, iNOS o NOS2) y 3) *endotelial* (Tipo III, eNOS o NOS3). NOS3 participa en procesos de vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria (Maul et al. 2003). Además, interviene en la mayoría de los procesos reproductivos de las hembras (Mashimo y Goyal 1999; Thaler y Epel 2003); siendo, entre otras cosas, un importante mediador del flujo sanguíneo uteroplacentar durante la gestación.

Existen líneas de ratones deficientes (knock-out o KO) para cada una de las tres isoformas, lo que facilita el estudio de la acción de NOS (Hefler et al. 2001; Gregg et al. 2003). En los ratones *Nos3*-KO (Mashimo y Goyal 1999; Gregg et al. 2003), la ausencia de NOS3 se ha considerado como la causa directa de una reducción en el número de descendientes y en el peso de los recién nacidos (Van Engelen et al. 1995; Hefler et al. 2001; Longo et al. 2004; Van der Heijden et al. 2005). Estudios previos han relacionado estos efectos con un menor crecimiento de los fetos y un aumento de la mortalidad al final de la gestación (Hefler et al. 2001; Van der Heijden et al. 2005). Sin embargo, también se ha observado que, en periodos más tempranos, la ausencia de NOS3 en estos ratones provoca una disminución en la perfusión placentaria (Longo et al. 2004; Van der Heijden et al. 2005) y alteraciones en la remodelación de la arteria uterina (Bennett et al. 1989). Además, otros estudios han destacado la importancia de NOS3 en procesos de implantación y desarrollo temprano del embrión (Gouge et al. 1998; Mashimo et al. 1999; Purcell et al. 1999; Gaglioti et al. 2000; Thaler et al. 2003).

Sin embargo, hasta el momento, los resultados obtenidos, en esta y en otras líneas con problemas reproductivos, proceden de ensayos realizados post-mortem con embriones

o fetos en edades específicas; lo que impide el seguimiento del desarrollo embrionario durante la gestación en los mismos individuos.

Nuestro objetivo, por tanto, fue la valoración de la utilidad de la ultrasonografía para el estudio de posibles alteraciones durante el desarrollo embrionario en líneas de ratón con problemas reproductivos y, concretamente, en el caso de los ratones *Nos3*-KO. Para ello, se desarrollaron dos estudios en que se llevó a cabo el seguimiento de la gestación en hembras *Nos3*-KO y control gestantes, con el fin de valorar la implantación y la incidencia de pérdidas embrionarias que afectan los índices de prolificidad (Experimento 3), y evaluar las curvas de crecimiento de embriones y anejos placentarios que puedan determinar el tamaño de los neonatos y su posterior viabilidad (Experimento 4).

*Experimento 3. Utilidad de la ultrasonografía para la valoración de la frecuencia y el momento de aparición de pérdidas embrionarias durante la gestación de hembras Nos3-KO y su control*

### **Animales y toma de datos**

Este ensayo se realizó sobre 8 hembras adultas B6.129P2-*Nos3<sup>tm1</sup>Unc/J*, en un noveno retrocruce (N9) con ratones C57BL/6J (grupo *Nos3<sup>-/-</sup>*) y 12 hembras control C57BL/6J (grupo *Nos3<sup>+/+</sup>*); todas ellas gestantes por monta tras una sincronización de celo administrando progesterona y prostaglandina (Anexo 2)

La observación ultrasonográfica de las estructuras embrionarias fue realizada entre los Días 6,5 y 15,5 de gestación, recogiendo la siguiente información para cada ratona:

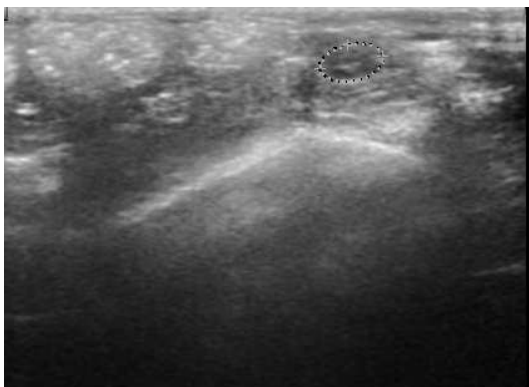
- 1) Número de embriones totales.
- 2) Número de embriones viables.
- 3) Número de embriones no viables, determinado por la visualización de embriones con ausencia de latido cardíaco o aparición de procesos de reabsorción (vesículas desestructuradas o de tamaño considerablemente menor al esperado).
- 4) Número de pérdidas embrionarias, que se obtiene determinando la desaparición de embriones comparado con los días previos.

### **Análisis de los datos**

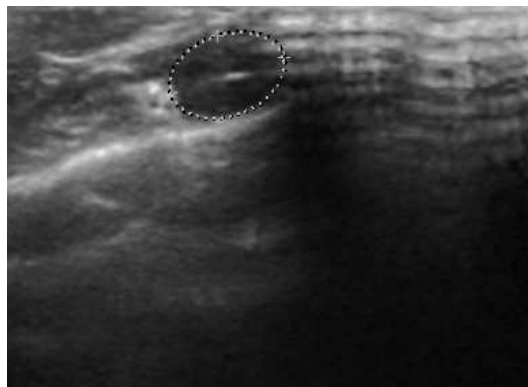
Los efectos del genotipo sobre los índices de implantación y, posteriormente, sobre la prolificidad fueron valorados mediante análisis de varianza (ANOVA). Los efectos del genotipo en la presencia y pérdida (determinado a partir del cociente entre los embriones perdidos y el total de embriones en el primer chequeo) de embriones durante la gestación fueron determinados por análisis de varianza para medias repetidas (split-plot ANOVA) Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  E.S.M. y los análisis se consideraron estadísticamente significativos para  $P < 0,05$ .

## Resultados

En la primera visualización de los embriones, entre 6,5 y 8,5 días de gestación (Figura 3.1 y 3.2), pudo observarse que el número de embriones implantados en *Nos3<sup>+/-</sup>* fue mayor que en *Nos3<sup>-/-</sup>* ( $7,5 \pm 0,4$  y vs  $4,0 \pm 0,4$ ;  $P < 0,005$ ); el rango osciló entre 6 y 10 en *Nos3<sup>+/-</sup>* y entre 2 y 5 en *Nos3<sup>-/-</sup>*.



**Figura 3.1.** Implantaciones en hembra *Nos3-KO* a Día 5,5 pc.



**Figura 3.2.** Implantaciones en hembra *Nos3-KO* a Día 8,5 pc.

El seguimiento de la gestación evidenció pérdidas embrionarias en el 62,5% de las hembras *Nos3<sup>-/-</sup>* y el 16,7% de las hembras control ( $P < 0,005$ ). El porcentaje de embriones perdidos osciló entre el 25 y el 100% en *Nos3<sup>-/-</sup>* ( $49,9 \pm 0,1\%$ ), mientras que se mantuvo alrededor del 20% en las controles ( $P < 0,005$ ).

En cuanto al momento en que se produjeron las pérdidas, fue en los Días 10,5 y 11,5 pc en los animales control y entre los Días 8,5 y 13,5 pc en animales *Nos3<sup>-/-</sup>*. En este último grupo, el mayor porcentaje de pérdidas se produjo en el periodo entre 8,5 y 10,5 días pc (55,6% de las pérdidas totales), seguido por el Día 13,5 pc (44,4% de las pérdidas totales).

#### Experimento 4. Utilidad de la ultrasonografía para la determinación de diferencias fenotípicas durante la embriogénesis en hembras gestantes *Nos3* KO y su control

##### **Animales y toma de datos**

Este ensayo se realizó sobre 7 hembras adultas B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1Unc/J</sup>, en un noveno retrocruce (N9) con ratones C57BL/6J (grupo *Nos3*<sup>-/-</sup>) y 12 hembras control C57BL/6J (grupo *Nos3*<sup>+/+</sup>); todas ellas gestantes por monta natural tras celo espontáneo.

La observación ultrasonográfica de las estructuras gestacionales fue realizada entre los Días 4,5 y 15,5 pc. A partir de los resultados obtenidos en el Experimento 2 de la presente Memoria, se consideraron, como parámetros más representativos en el estudio de la gestación, el tamaño de la vesícula embrionaria, el diámetro del tronco y la longitud cráneo-caudal del embrión o feto.

##### **Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron agrupados por día de gestación y se realizó un estudio estadístico usando análisis lineales y cuadráticos standard. Las curvas de regresión predictivas para cada variable fueron calculadas por el mejor ajuste de datos en términos de su coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Los efectos de la línea sobre el tamaño del embrión o feto en diferentes días de gestación se valoraron por un análisis de varianza para medias repetidas (split-plot ANOVA). Los valores de los parámetros se expresan como  $\pm$  E.S.M., aceptándose como significativamente estadístico desde  $P < 0,05$ .

##### **Resultados**

La imagen ultrasonográfica correspondiente a las vesículas embrionarias fue identificada desde el Día 4,5 tras el tapón vaginal y durante toda la gestación (Figura 4.1).

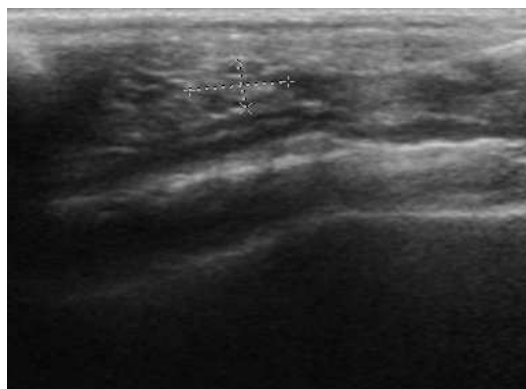


**Figura 4.1.** Vesículas embrionarias en hembra *Nos3*-KO a Día 4,5 pc.

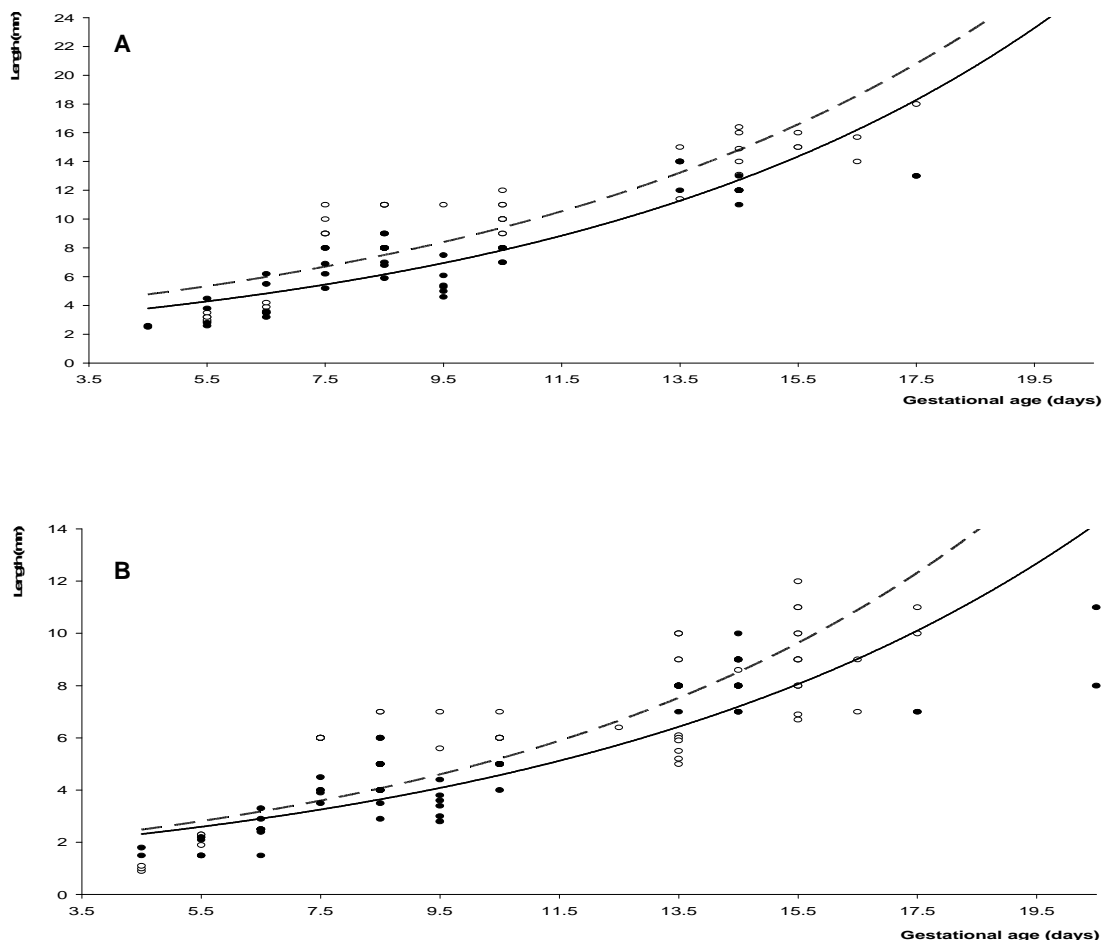
El valor del diámetro longitudinal de las vesículas embrionarias (Figura 4.2) aumentó de forma exponencial (Grafica 4.1 A) desde la primera visualización, en el Día 4,5 pc, hasta el Día 18,5 pc; tanto en *Nos3*<sup>-/-</sup> ( $y = 2,2068e^{0,1208x}$ ,  $r^2 = 0,674$ ;  $P < 0,0005$ ) como en *Nos3*<sup>+/+</sup> ( $y = 2,8702e^{0,1132x}$ ,  $r^2 = 0,671$ ;  $P < 0,0005$ ). En la comparación entre genotipos se observa que esta medida fue significativamente mayor en *Nos3*<sup>+/+</sup> desde el Día 10,5 pc ( $10,0 \pm 0,3$  vs  $7,7 \pm 0,2$ ;  $P < 0,0005$ ). El diámetro transversal de la vesícula (Figura 4.3) también aumentó exponencialmente (Grafica 4.1 B) para los dos grupos (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 1,3913e^{0,1133x}$ ,  $r^2 = 0,723$ ;  $P < 0,0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1,4274e^{0,1234x}$ ,  $r^2 = 0,652$ ,  $P < 0,0005$ ); de nuevo, los valores fueron más altos en *Nos3*<sup>+/+</sup> desde el Día 10,5 de gestación ( $5,8 \pm 0,2$  vs  $4,8 \pm 0,1$ ;  $P < 0,005$ ).



**Figura 4.2.** Diámetro longitudinal de la vesícula embrionaria en hembra *Nos3*-KO a Día 5,5 pc.



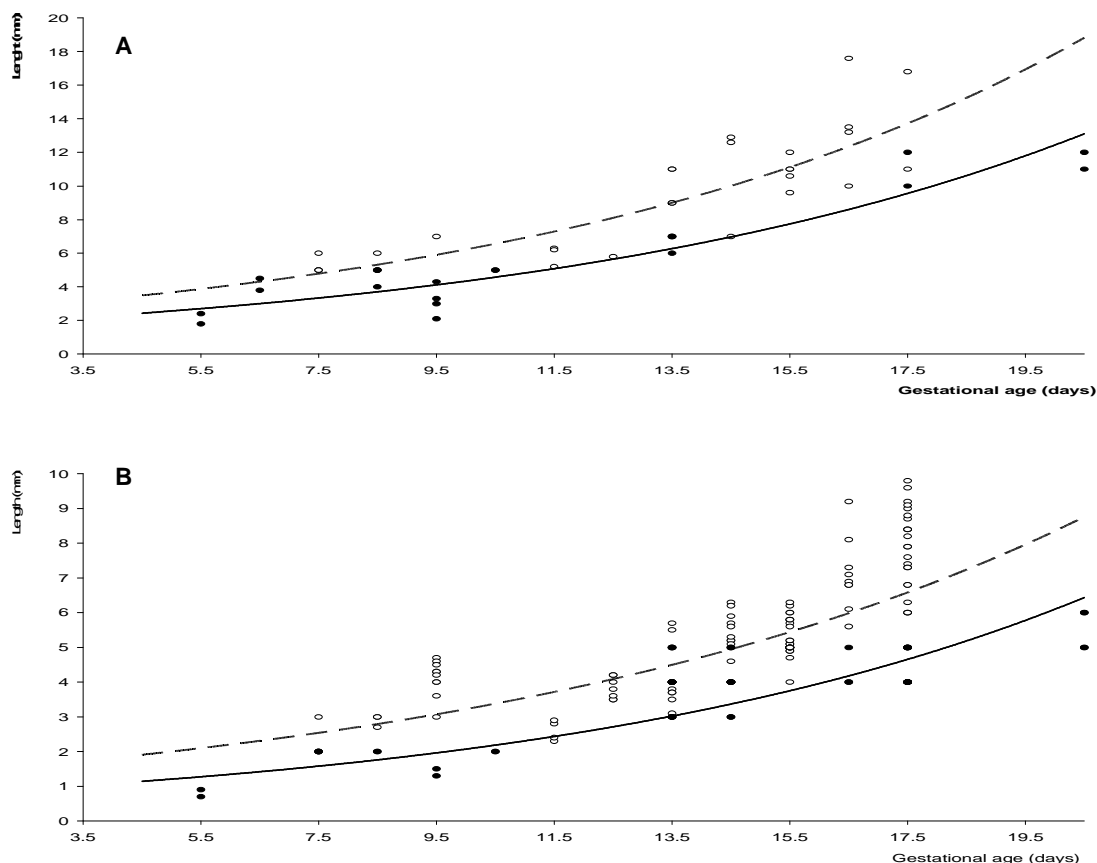
**Figura 4.3.** . Diámetro longitudinal y transversal de la vesícula embrionaria en hembra *Nos3*-KO a Día 5,5 pc.



**Gráfica 4.1.** Curvas de regresión que muestran la relación del diámetro longitudinal (A) y el diámetro transversal (B) de las vesículas embrionarias con la edad de gestación en hembras *Nos3*-KO (círculos negros y línea continua) y hembras control C57BL/6J (círculos blancos y línea discontinua).

La longitud cráneo-caudal (Gráfica 4.2. A) y el diámetro del tronco de los embriones y fetos (Gráfica 4.2. B) pudieron ser medidos desde el Día 5,5 al Día 18,5 de gestación. La evolución de la longitud cráneo-caudal fue también exponencial en ambos grupos (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 1,5149e^{0,1053x}$ ,  $r^2 = 0,776$ ,  $P < 0,0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1,4274e^{0,1234x}$ ,  $r^2 = 0,652$ ,  $P < 0,005$ ), al igual que el diámetro del tronco (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 0,6971e^{0,1089x}$ ,  $r^2 = 0,783$ ,  $P < 0,0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1,2392e^{0,0952x}$ ,  $r^2 = 0,588$ ,  $P < 0,0005$ ). Ambos parámetros fueron mayores en *Nos3*<sup>+/+</sup> desde el Día 8,5 de gestación ( $5,5 \pm 0,5$  vs  $4,6 \pm 0,3$ ,  $P < 0,005$  para la longitud cráneo caudal;  $2,9 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,1$ ,  $P < 0,005$  para el diámetro del tronco).

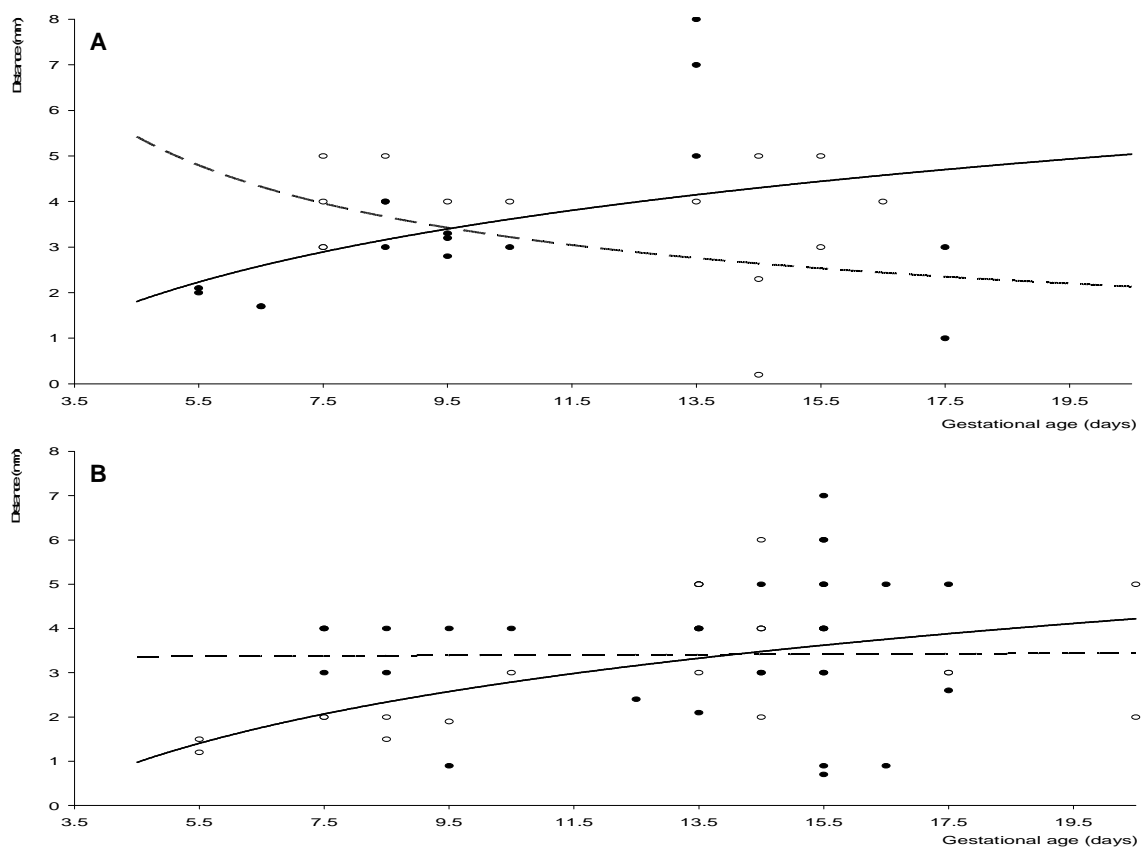




**Gráfica 4.2.** Curvas de regresión que muestran la relación de la longitud cráneo-caudal **(A)** y el diámetro del tronco **(B)** con la edad gestacional en *Nos3*-KO (círculos negros y línea continua) y hembras control C57BL/6J (círculos blancos línea discontinua).

El análisis conjunto de estos resultados muestra que el crecimiento relativo del embrión/feto y de los anejos gestacionales siguieron patrones diferentes en *Nos3*<sup>-/-</sup> y *Nos3*<sup>+/+</sup>. En los controles *Nos3*<sup>+/+</sup>, la distancia entre el límite externo del saco gestacional y el embrión disminuye en secciones longitudinales (es decir, el embrión crece relativamente más que la vesícula) o se mantiene constante en secciones transversales (Gráfica 4.3).

En el genotipo *Nos3*<sup>-/-</sup> hay una tendencia, durante toda la gestación, al incremento de la distancia en ambas proyecciones; es decir, hay un retraso en el crecimiento de los embriones respecto a la vesícula. En realidad, ambas curvas, longitudinal y transversal, están compuestas de un primer periodo con incremento significativo en la diferencia entre las medidas de los embriones y las medidas de vesículas gestacionales (Día 5,5 a 14,5 pc;  $r^2 = 0,752$ ,  $P < 0,005$  para la sección longitudinal y  $r^2 = 0,772$ ,  $P < 0,005$  para medidas transversales) y un segundo periodo desde el Día 14,5 de gestación en el que los cambios no son significativos.



**Grafica 4.3.** Curvas de regresión que muestran la relación de las medidas del embrión/feto y anexos gestacionales en sección longitudinal **(A)** y sección transversal **(B)** con la edad gestacional en *Nos3-KO* (círculos negros y línea continua) y hembras control C57BL/6J (círculos blancos línea discontinua).

## **Discusión del objetivo 2**

El análisis conjunto de ambos experimentos muestra la utilidad de la ultrasonografía para la valoración de la gestación y la identificación de puntos críticos que afectan la fertilidad y prolificidad, tanto en hembras control como en hembras con problemas reproductivos. La aplicación de un seguimiento ultrasonográfico ha permitido determinar, en el caso concreto de la línea *Nos3-KO*, que la aparición de pérdidas embrionarias y de retrasos en el desarrollo del resto de las crías se establece en momentos coincidentes, y muy concretos, de la gestación.

En los ratones utilizados como control, las pérdidas embrionarias afectaron sólo a aproximadamente un 17% de las hembras; en éstas, fueron escasas (alrededor de un 20% de la camada) y se identificaron entre los Días 10,5 y 11,5 de gestación; lo que puede ser un reflejo de alteraciones en el proceso de gastrulación (Boucher y Pedersen 1996) o en el desarrollo del corazón y la circulación feto-placentaria (Chen y Hsu 1982; Flamme et al. 1997) que se producen en días anteriores. El resto de las estructuras gestacionales creció de forma exponencial durante el periodo de gestación, en coincidencia con los resultados del Experimento 2 de la presente Memoria; caracterizándose por un mayor crecimiento relativo del embrión sobre su vesícula.

En las ratonas *Nos3-KO*, el número de embriones que lograron implantarse fue significativamente menor que en las hembras control y, posteriormente, las pérdidas embrionarias afectaron al 62,5% de las hembras gestantes; oscilando entre el 25% de los embriones y el total de la camada, con dos picos principales (Días 8,5-10,5 y Día 13,5 pc). El resto de los embriones mostró alteraciones en su desarrollo en comparación con los animales control. En primer lugar, el crecimiento absoluto de la vesícula embrionaria y el embrión es menor, desde los Días 8,5 y 10,5 pc; en segundo lugar, el crecimiento relativo del embrión respecto a su vesícula embrionaria es deficiente durante los primeros 14,5 días de gestación. Los periodos de detección de diferencias en el desarrollo embrionario en el Experimento 4 son coincidentes con las etapas en que se detectaron pérdidas embrionarias en el Experimento 3.

Ambos periodos son críticos para el desarrollo embrionario. La etapa que comprende los Días 8,5 y 10,5 pc, como se ha señalado anteriormente, se relaciona con el proceso de gastrulación (Boucher y Pedersen 1996), con el origen del corazón y el establecimiento de la circulación sanguínea en el saco vitelino (Chen y Hsu 1982) y la

aparición de los islotes sanguíneos y las células endoteliales y hematopoyéticas (Flamme et al. 1997). La etapa que comprende los Días 12,5 y 14,5 pc se relaciona con la transición entre los estadios de embrión tardío y feto temprano (Evans y Sack 1973), en que finaliza la organogénesis y se inician la osificación y el crecimiento terminal.

Pero, además, estas alteraciones constituyen la base de las deficiencias en el tamaño y la viabilidad de los neonatos y el crecimiento juvenil que presenta esta línea (Longo et al. 2004). Un adecuado desarrollo del embrión durante los primeros estadios de la gestación es esencial; alteraciones durante la concepción, implantación y desarrollo temprano pueden perturbar no sólo el establecimiento de la gestación como efecto inmediato, sino también el desarrollo de fetos, neonatos y adultos, como se ha demostrado en otras especies (Edwards et al. 2002; Symonds et al. 2007), originando nacimientos prematuros y disminución de peso al nacimiento (Bloomfield et al. 2003) o enfermedades de retraso metabólico, nerviosas y cardiovasculares en el adulto (Gopalakrishnan et al. 2005).

Estos efectos pueden relacionarse con factores genéticos, infecciosos y, principalmente, nutricionales (Anthony et al. 2003; Bloomfield et al. 2003; Gardner et al. 2004; Martin et al. 2004; Oliver et al. 2005) y pueden verse enmascarados por efectos individuales cuando se realizan estudios post-mortem estáticos; por ello, es determinante un seguimiento ecográfico dinámico que permita establecer las curvas de crecimiento embrionario y fetal (Harding 2001), el crecimiento relativo del embrión y sus membranas (que permite diferenciar procesos de retardo en el crecimiento, preeclampsia, hidroamnios e hidroalantoides) y el tipo de retraso en el crecimiento (simétrico en factores genéticos e infecciosos y asimétrico en nutricionales y alteraciones placentarias como preeclampsia (Anthony et al. 2003).

En conclusión, estos resultados demuestran, de nuevo, la utilidad de la ultrasonografía como método para detectar posibles cambios fenotípicos durante la gestación; en este caso, en roedores modificados genéticamente: cambios que pueden estar correlacionados con alteraciones al nacimiento o en la fase adulta. Así, estos resultados pueden ser la base de futuros modelos de estudio que evalúen el efecto de fallos en el desarrollo embrionario durante estadios tempranos de gestación sobre el crecimiento fetal, tiempo gestacional, peso y viabilidad al nacimiento y aspectos adversos en la salud durante la vida juvenil y adulta.



### **3.3. Objetivo 3. Utilidad de la ultrasonografía biomicroscópica como técnica histológica virtual para la caracterización *in vivo* de cambios fenotípicos durante la embriogénesis en ratón.**

Los estudios de morfogénesis en ratón se han basado tradicionalmente en la observación histológica de los tejidos obtenidos a partir de una necropsia o una cirugía previa; por tanto, son procedimientos incompatibles con estudios dinámicos y continuados en el mismo animal. Además, para llevar a cabo la visualización de diferentes estructuras, es necesario fijar el embrión, incluirlo en parafina, cortarlo, teñirlo, fotografiarlo y, posteriormente, realizar una reconstrucción seriada de los cortes obtenidos. Esta complejidad técnica limita los estudios a estadios tempranos de gestación o estructuras muy determinadas, puesto que, en edades más avanzadas, el mayor tamaño de los embriones o fetos impide la manipulación y hace necesario un mayor número de cortes (Brune et al. 1999). Este proceso podría ser notablemente mejorado mediante técnicas de imagen no invasivas que, además, permitirían la repetición de las observaciones; obteniéndose, con ello, datos secuenciales, inapreciables en campos como la embriogénesis, en el que los cambios fenotípicos son continuos y rápidos (Theiler, 1989).

En los experimentos anteriores, se estableció la utilidad de la ultrasonografía para la valoración y medición de estructuras gestacionales desde el Día 4,5 de gestación hasta prácticamente el parto, de forma rápida, sencilla y sin necesidad de anestesia (Experimentos 1 y 2); pudiendo ser incorporada a estudios de morfogénesis en embriones mutantes y sus controles (Experimentos 3 y 4). Pero, además, es especialmente importante la posibilidad de visualización a tiempo real que ofrecen los ultrasonidos; por ello, estos estudios incluyen una cuarta dimensión, el tiempo. Las observaciones en tiempo real permiten observar los movimientos en el interior del saco gestacional; hecho que resulta de especial importancia cuando se estudian estructuras dinámicas, como es el caso del sistema vascular. El problema de las sondas de ultrasonografía convencionales (frecuencias de 10-15 MHz) es que sólo ofrecen una resolución espacial del orden de milímetros; que es adecuada para un estudio general del embrión, pero insuficiente para visualizar detalles microscópicos de sus diferentes tejidos.

La ultrasonografía biomicroscópica (UBM) se basa en la utilización de sondas de muy alta frecuencia (entre 30-55 MHz), que alcanzan una resolución de 30-50  $\mu\text{m}$ , muy cercana a la histología convencional. La UBM es un método no invasivo de histología virtual susceptible de ser aplicado para estudios secuenciales y detallados de morfogénesis; ofrece visión en tiempo real, permite la representación tridimensional del embrión y es especialmente recomendable para la observación de tejidos blandos, por lo que puede ser el método de elección en estudios de embriogénesis. La UBM ha sido aplicada en estudios de microimagen experimental en ratón (revisado por Kulandavelu et al. 2006); principalmente en observaciones estáticas con modelos *ex vivo*.

Por ello, el objetivo de este estudio fue valorar su utilidad para la visualización *in vivo* de los cambios fenotípicos del embrión y la realización de estudios dinámicos secuenciales de la morfogénesis en el ratón, desde el momento de la implantación al final de la organogénesis, sin el sacrificio de la madre.

*Experimento 5. Utilidad de la ultrasonografía biomicroscópica para la visualización microscópica in vivo de las estructuras embrionarias desde la implantación al final de la organogénesis*

### **Animales y toma de datos**

Este ensayo se realizó sobre 22 hembras adultas C57BL/6J; todas ellas gestantes por monta natural, tras sincronización de celos con el protocolo hormonal basado en la administración de progesterona y prostaglandina que se describe en el Anexo 2.

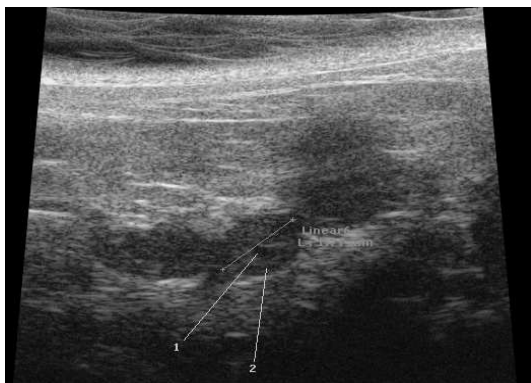
La observación ultrasonográfica de las estructuras embrionarias fue realizada entre los Días 4,5 y 15,5 de gestación (que se corresponderían con los estadios 6 al 24 de Theiler, TS), observándose una o dos ratonas en cada día de gestación. Este intervalo de estudio fue dividido en tres periodos (post-implantacional temprano, finalización de la organogénesis y transición entre embrión tardío y feto temprano), de acuerdo con Evans y Sack (1973) y Kaufman (1992). Una vez realizada la observación ultrasonográfica, se sacrificaba la hembra y se extraían al menos dos embriones para llevar a cabo la validación de la técnica.

A pesar de que las observaciones podrían realizarse sin anestesia, para obtener una mayor calidad de imagen, y teniendo en cuenta que las hembras serían sacrificadas para realizar la validación de la técnica, se aplicaba anestesia inhalatoria con isoflurano y se realizaba depilación de la región abdominal y los flancos.

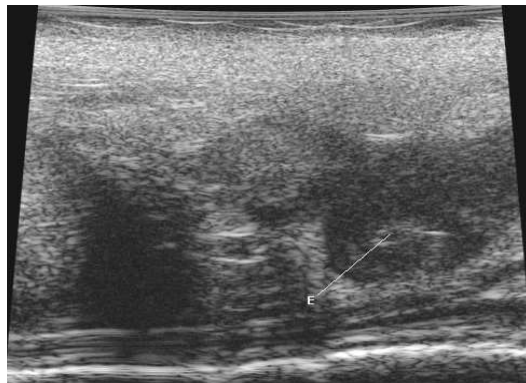
### **Resultados**

El estudio secuencial realizado con UBM ha permitido detectar y valorar la gestación desde el primer día de estudio (4,5 días pc; TS 6); es decir, en el periodo post-implantacional temprano. Las imágenes obtenidas en ese momento se identifican como estructuras esféricas, que se corresponden con la reacción decidual en los lugares de implantación (Figura 5.1).



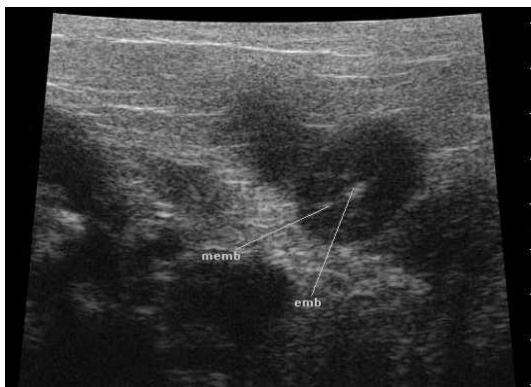


**Figura 5.1.** Primeras estructuras visualizadas durante la gestación. Vesículas embrionarias en hembra C57BL/6J a Día 4,5 pc, con sonda lineal de 40 MHz.



**Figura 5.2.** Vesículas embrionarias y embrión en hembra C57BL/6J a Día 5,5 pc, con sonda lineal de 40 MHz.

Veinticuatro horas después, en el Día 5,5 pc (Figura 5.2), las vesículas embrionarias se observaron más alargadas y la reacción endometrial fue más evidente y, en los Días 6,5 y 7,5 pc (TS 7-11), fue posible diferenciar claramente el embrión y sus membranas (Figuras 5.3 y 5.4).



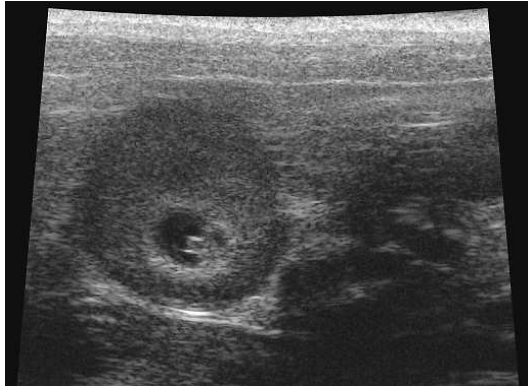
**Figura 5.3.** Vesículas embrionarias, embrión y membranas en hembra C57BL/6J a Día 6,5 pc, con sonda lineal de 40 MHz.



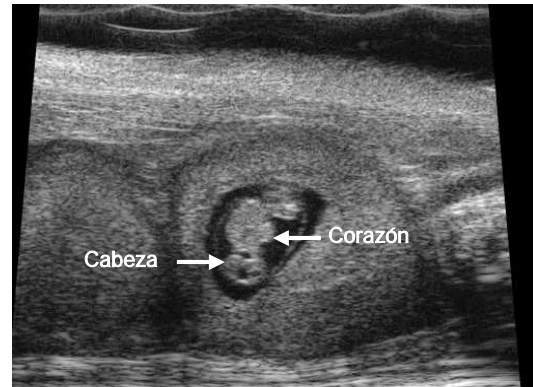
**Figura 5.4.** Vesículas embrionarias, con el embrión y las tres capas presentes en este estadio, en hembra C57BL/6J a Día 7,5 pc, con sonda lineal de 40 MHz.

El periodo comprendido entre TS 12 y 14 (Días 8,5 y 9,5 pc) coincide con el proceso de rotación axial del embrión. Asimismo, se establecen los primeros movimientos de latido en el primordio cardíaco y el comienzo de la perfusión umbilico-placental; procesos observables por UBM y coincidentes con las observaciones macroscópicas (Figuras

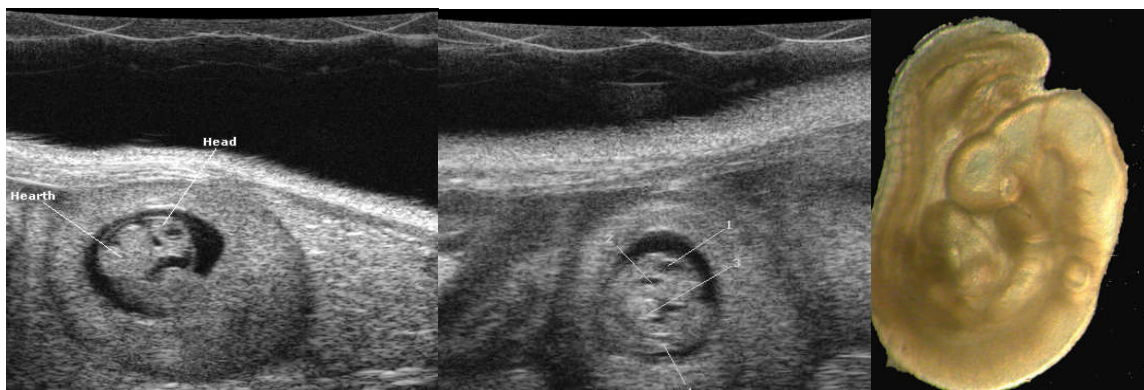
5.5, 5.6 y 5.7). Por el contrario, en estas primeras sesiones se observó la imposibilidad de determinar el tamaño de la camada, debido a la pequeña área de exploración del transductor.



**Figura 5.5.** Vesícula embrionaria, embrión en su interior y placenta de hembra C57BL/6J a 8,5 pc con sonda lineal de 40 MHz.



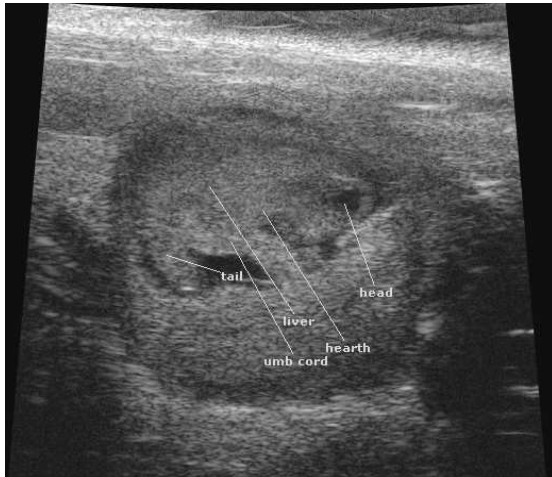
**Figura 5.6.** Vesícula embrionaria, embrión en el interior con sus membranas. Se diferencian cabeza y cámaras cardíacas de hembra C57BL/6J a 9,5 pc con sonda lineal de 40 MHz.



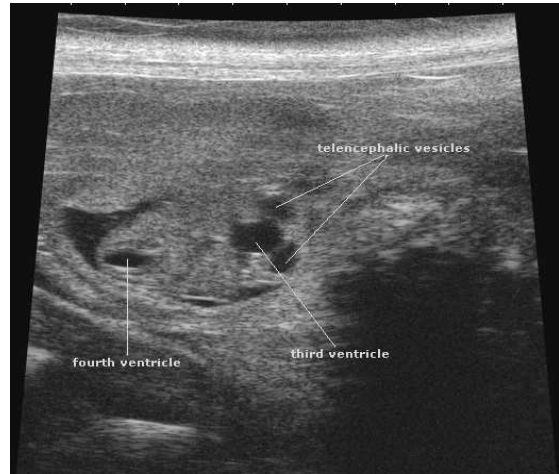
**Figura 5.7.** Vesícula embrionaria, embrión en el interior con sus membranas. Se diferencia cabeza y cámaras cardíacas de hembra C57BL/6J a 9,5 pc con sonda lineal de 40 MHz. Validación de la técnica (derecha) por extracción del embrión a 9,5 pc y visualización en lupa.

El periodo de organogénesis se completa entre los días 10,5 y 12,5 pc (TS 17-21) y se caracteriza por profundos cambios en la imagen por UBM del embrión, que se corresponden con cambios macroscópicos (Figuras 5.8 a 5.14). Estos cambios se evidencian principalmente en la región cefálica y el sistema circulatorio.

En la región cefálica se observan cavidades que se corresponden con el mesencéfalo, el telencéfalo, las vesículas ópticas y óticas y el cuarto ventrículo; en el sistema cardiovascular pueden realizarse estudios detallados debido al aumento de tamaño del corazón y el desarrollo de la vasculogénesis.



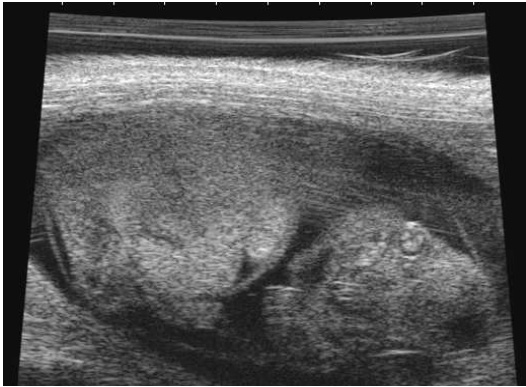
**Figura 5.8.** Embrión en el interior con zonas diferenciadas: Cabeza y corazón , hígado y cordón umbilical de hembra C57BL/6J a 10,5 pc con sonda lineal de 40 MHz.



**Figura 5.9.** Región cefálica de embrión con vesículas telencefálicas, tercer y cuarto ventrículo, de hembra C57BL/6J a 10,5 pc con sonda lineal de 40 MHz.



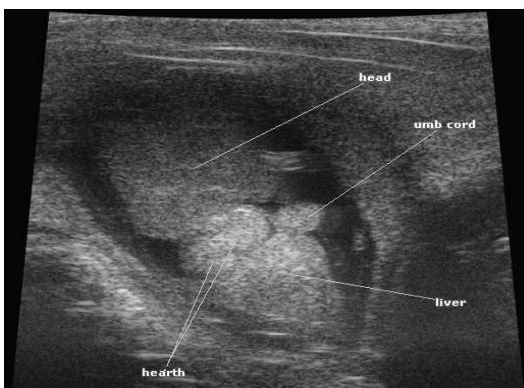
**Figura 5.10** Validación de la técnica por extracción del embrión de hembra C57BL/6J y visualización en lupa a 10,5 pc



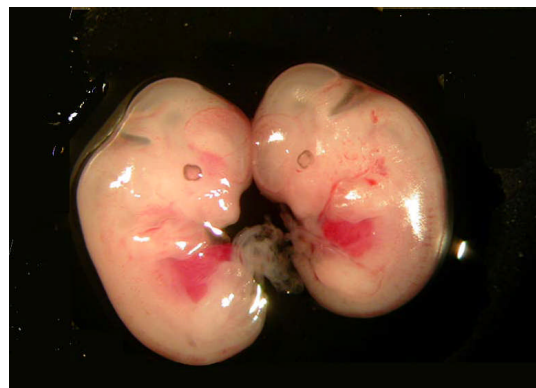
**Figura 5.11** Embrión de hembra C57BL/6J a 12,5 pc. Se diferencia cabeza (ojo) rostro y tronco con sonda de 40 MHz.



**Figura 5.12** Embrión de hembra C57BL/6J a 12,5 pc. Se diferencia cabeza con ventrículos cerebrales, tronco y cámaras cardíacas aun externas al cuerpo con sonda de 40 MHz.



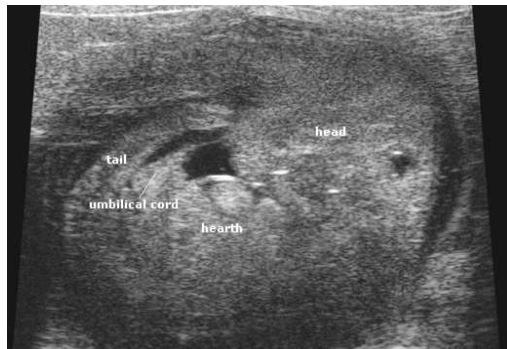
**Figura 5.13** Embrión de hembra C57BL/6J a 12,5 pc. Se diferencia cabeza, tronco hígado y cámaras cardíacas con sonda de 40 MHz.



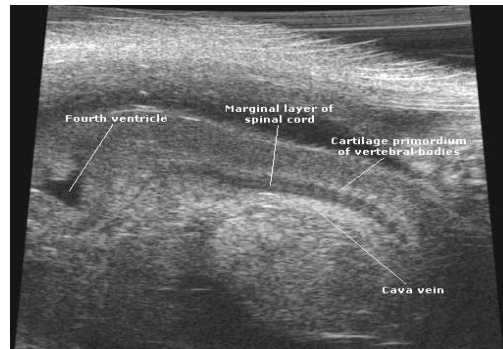
**Figura 5.14.** Embriones de hembra C57BL/6J a 12,5 pc. Validación de la técnica. Se observa la transparencia de los ventrículos cerebrales.

El periodo desde el Día 13,5 a 15,5 pc (TS 22-24) se caracteriza principalmente por la evolución de las estructuras externas hasta adquirir el estado adulto, el desarrollo de los órganos del embrión y el inicio de los procesos de osificación del sistema esquelético (Figuras 5.15 a 5.20). La UBM es especialmente útil en este periodo para visualizar procesos claves en biología, como la separación interatrial e interventricular y la aparición de válvulas en el corazón, la diferenciación de los ojos y la interdigitalización de las manos y los pies para dar lugar a los futuros dedos; datos que coinciden con las validaciones de la técnica.





**Figura 5.14.** Embrión de 13,5 pc. Cabeza, tronco hígado, cámaras cardíacas, cordón umbilical y cola.



**Figura 5.15.** Embrión de 13,5 pc. Cabeza con cuarto ventrículo, y en tronco primordios cartilaginosos de las vértebras y vena cava.



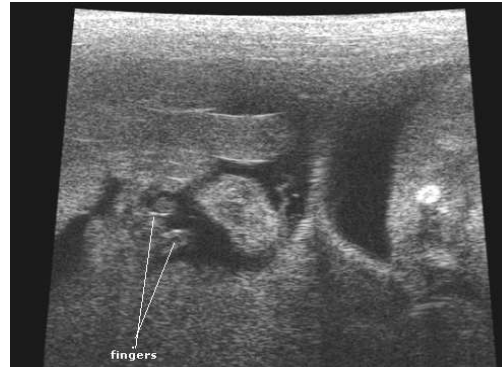
**Figura 5.16.** Embrión de 13,5 pc. Validación de la técnica. Disminución de transparencia de los ventrículos cerebrales y comienzo de la interdigitación.



**Figura 5.17.** Embrión de 14,5 pc. Interdigitación. Comparar con la mayor separación de los dedos en la figura 5.19.



**Figura 5.18.** Embrión de 15,5 pc. Validación de la técnica. Falta de transparencia de los ventrículos cerebrales y casi total interdigitación.



**Figura 5.19.** Embrión de 15,5 pc. Se observa la interdigitación.



**Figura 5.20.** Embrión de 15,5 pc. Ojo y comienzo de osificación de la cabeza.

## Discusión

Los resultados de este estudio confirman la utilidad de la UBM como técnica de imagen no invasiva para la observación *in vivo* del desarrollo de la gestación en ratón.

En la observación de las estructuras gestacionales, la alta frecuencia de la sonda de UBM ha permitido la obtención de imágenes con una resolución entre 30-50  $\mu\text{m}$ , cercana a las obtenidas mediante microscopía y equivalentes a las imágenes descritas previamente en estudios histológicos convencionales (Theiler 1989; Kaufman 1992). El hecho de que la UBM permita estudios seriados sin sacrificio del animal es crucial para estudios detallados de los componentes celulares en órganos y tejidos durante el crecimiento embrionario; pudiendo ampliarse, por tanto, los estudios de morfogénesis con datos de dinámica de desarrollo.

La alta resolución de la UBM ha permitido, en nuestro estudio, evaluar la gestación desde el Día 4,5 pc (en que se produce la implantación, Kaufman 1992), mediante la visualización de la reacción endometrial en los lugares de implantación. Estudios previos describen la visualización de la gestación desde el Día 6,5 (Kulandavelu et al. 2006) y 8,5 pc (Ji et al. 2003); de nuevo, este estudio es, en nuestro conocimiento, el más temprano de imagen de gestación en ratón. La precocidad, como ya se ha dicho anteriormente, es un factor esencial en los estudios de embriogénesis; en este caso, la UBM sería muy útil para estudios relacionados con la eficiencia en la implantación, factor frecuente de infertilidad. Por otro lado, debe considerarse que alteraciones en el desarrollo embrionario temprano afectan al tamaño definitivo y las características individuales del neonato y, posteriormente, del adulto.

Una vez producida la implantación, la UBM muestra ser útil para el seguimiento de la dinámica de desarrollo. Nuestro estudio es también la primera descripción de visualización seriada en detalle de estructuras embrionarias y fetales en ratón, desde la implantación hasta el final de la organogénesis, confirmando y ampliando estudios previos basados en observaciones específicas del sistema cardiovascular y la circulación feto-placentaria en días seleccionados (Ji et al. 2003; Phoon y Turnbull 2003; Zhoy et al. 2002, 2003; Lichert et al. 2004; Phoon et al. 2004, 2004; Kulandavelu et al. 2006)

Las imágenes obtenidas en tiempo real y con alta resolución mediante el uso de UBM son excelentes para estudios secuenciales vasculares, pero pueden ser también importantes para estudios en otras áreas de interés en morfogénesis, como la diferenciación de placenta (Mardon et al. 2007), cresta neural (Dupin et al. 2006), región cefálica (Chai et al. 2006), ojo (Tedesco et al. 2006), órganos como pulmón, hígado y riñones (Dressler 2006; Maeda et al. 2007; Zorn y Weills 2007), médula espinal (Levine y Brvanlou 2007), sistema esquelético (Padmanabhan et al. 2008) y miembros (Duboule et al. 2007).

En este experimento, las sesiones de UBM fueron realizadas sobre ratonas anestesiadas, pero pueden realizarse sin anestesia; la realización de observaciones en animales no anestesiados presentaría una ventaja adicional, porque permite repeticiones seriadas de chequeos sin efectos de la anestesia sobre la madre y los fetos y sin sus posibles consecuencias sobre el desarrollo embrionario (Mazze et al. 1985) y sin interferencia en estudios de sistemas dinámicos, como el cardiovascular. El estrés que se puede generar en la maniobra de inmovilización es mínimo, teniendo en cuenta la posibilidad de grabar las observaciones y visualizar posteriormente las secuencias, pudiendo liberar inmediatamente al animal.

Por el contrario, y en discrepancia con Kulandavelu et al (2006), la UBM presenta como desventaja su inaptitud para llevar a cabo el conteo de los fetos y, con ello, la determinación del tamaño de la camada o la detección de pérdidas embrionarias; esto es debido a que el uso de frecuencias de emisión tan altas como 40MHz reduce el área de exploración a rangos tan pequeños (alrededor de 10 mm) que impiden la determinación fiable del número de fetos durante la exploración. Para esta determinación, es más eficiente la ultrasonografía convencional (10 MHz, 35-40 mm de área de exploración) o la RMN, como se ha descrito en los experimentos anteriores.

En conclusión, la observación mediante UBM constituye una técnica adecuada para visualizar, *in vivo* y en tiempo real, cambios fenotípicos a nivel microscópico durante el desarrollo embrionario en el ratón, desde la implantación hasta el final de la organogénesis, sin necesidad de anestesia.







#### 4. DISCUSION GENERAL



El desarrollo, y la aplicación práctica, de las técnicas de diagnóstico por imagen experimenta un gran auge en la actualidad y, previsiblemente, en un futuro cercano. La imagen *in vivo* permite estudios tanto observacionales como mecanísticos en las diferentes áreas de conocimiento relacionadas con Ciencias de la Vida. Su aplicación posibilita la realización de esos estudios, sin sacrificio, en los mismos sujetos; así, estos se convierten en sus propios controles, pudiendo valorarse el punto de partida en un experimento, y, una vez iniciado el protocolo experimental, pueden obtenerse datos dinámicos del mismo individuo. Pero, además, la utilización de las mismas técnicas en sujetos experimentales y pacientes clínicos, facilita su aplicación para estudios traslacionales.

En la presente Memoria se ha llevado a cabo una valoración -en la revisión bibliográfica, en estudios previos y en el propio desarrollo experimental- de la aplicabilidad de estas técnicas para el seguimiento de la gestación y la embriogénesis en ratón. En primer lugar, por causas técnicas, descartamos el uso de la Tomografía Computerizada (TC o TAC), de la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y de la Imagen Óptica. Posteriormente, en dos estudios previos, se llevó a cabo la valoración de la utilidad de la imagen mediante Rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La primera técnica presenta como gran inconveniente el hecho de que es solamente útil en el último tercio de gestación, cuando comienza a producirse la osificación; por lo que los tiempos de aplicación se ven muy limitados. Y, precisamente, como se ha comprobado en este trabajo, los mayores cambios se producen en estadios tempranos del desarrollo embrionario; concretamente, en el periodo de organogénesis, entre la implantación y la osificación. Pero, además, no permitiría realizar observaciones continuadas por requerir anestesia e inmovilización total del animal.

El uso de la RMN permitió detectar la presencia de las vesículas embrionarias desde el Día 6,5 de gestación y detalles de los embriones y la placentación desde el Día 11,5 pc. Una ventaja adicional fue la posibilidad de visualizar el cuerpo completo de la madre, determinante para establecer adecuadamente el número de fetos, y que favorece la aplicación de esta técnica en estudios de letalidad embrionaria y retraso del crecimiento uterino. Sin embargo, los estudios secuenciales no son posibles y la técnica se ve limitada para este uso por la necesidad de anestesiarse e inmovilizar a la madre, y por los largos tiempos de examen en cada sesión, que comprometen su supervivencia y

la de sus fetos. Por otro lado, su uso para la observación de estructuras dinámicas, como el sistema cardiovascular del embrión, también se ve restringido por la necesidad de aplicar altas dosis de agentes de contraste.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se centró, primeramente, en el estudio de las técnicas basadas en ultrasonografía y en la utilidad de diferentes diseños de sondas (lineales y sectoriales) y frecuencias de emisión convencionales (7,5 y 10 MHz) para el diagnóstico (Experimento 1) y seguimiento (Experimento 2) de la gestación. En dos estudios posteriores (Experimentos 3 y 4), se determinó la aplicabilidad de la ultrasonografía para la identificación y valoración de puntos críticos que afectan la gestación y, con ello, la fertilidad y prolificidad en hembras con problemas reproductivos. Posteriormente, y como consecuencia de los resultados obtenidos, se evaluó la aplicabilidad de técnicas de ultrasonografía biomicroscópica, con sondas de 40 MHz, para el estudio detallado de la morfogénesis en diferentes órganos y sistemas del embrión de ratón (Experimento 5).

Los resultados de los dos primeros experimentos muestran que la ultrasonografía convencional se puede considerar como una técnica viable para el diagnóstico precoz, y el posterior seguimiento, de la gestación en ratón.

La primera visualización eficaz en la que se observa específicamente el lugar de implantación se consigue el Día 4,5 pc; la eficiencia para la detección de gestación alcanza el 100% en el Día 5,5 pc. En estos días puede ya realizarse la determinación del número de fetos, pero la fiabilidad de esta determinación fue escasa hasta el Día 8,5 de gestación. La precocidad y fiabilidad de las observaciones fue escasa cuando se utilizaron sondas de 7,5 MHz, debido a su baja resolución espacial, y adecuada usando transductores de 10 MHz; además, debe señalarse que se incrementa la calidad de la imagen utilizando sondas lineales.

La incorporación de la ultrasonografía convencional se puede considerar adecuada para el manejo de grandes grupos experimentales, puesto que los resultados, en cuanto diagnóstico de gestación y determinación del número de fetos, suponen una mayor precocidad y fiabilidad que la alcanzada mediante palpación abdominal. Pero, además, no precisa anestesia ni depilación del animal, y el tiempo de observación es breve (4-5 minutos); todo ello favorece el bienestar animal, minimizando el estrés y evitando posibles efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo pre- y post-natales.

Las ventajas de la técnica permiten la realización seriada de ultrasonografías durante varios días consecutivos y mediante el desarrollo del segundo experimento se obtuvo, para nuestro conocimiento, el primer estudio ultrasonográfico seriado de la visualización y medición de las diferentes estructuras gestacionales en ratón, desde el periodo peri-implantacional (Día 4,5 pc).

Entre las medidas efectuadas, aquellas más sencillas de obtener y de mayor correlación con la edad gestacional fueron el diámetro de la vesícula, la longitud cráneo-caudal, el diámetro del tronco, la longitud occipito-nasal y el diámetro biparietal.

Las medidas corporales (diámetro de la vesícula, longitud cráneo-caudal y diámetro del tronco) se encuentran determinadas por factores genéticos, concretamente relacionados con la línea y con el propio individuo, en función de la corpulencia. En el presente trabajo, los fetos CD1 fueron más grandes que los C57BL/6 J y estos más corpulentos que los BALB/c; lo que señala la necesidad de establecer curvas de crecimiento como referencia en las diferentes líneas. Pero, además, deben realizarse mediciones de varios fetos al encontrarse una alta variabilidad entre las diferentes crías de una misma camada. En el presente trabajo, se ha visto también como el background genético marcaba diferencias en las medidas craneanas (valores mayores en C57BL/6J que en BALB/c e incluso que en CD1, aun siendo ésta una línea más corpulenta) y en la frecuencia cardíaca (significativamente menor en BALB/c que en CD1 y C57BL/6J).

Estos hallazgos abren futuras líneas de trabajo sobre la aplicación de la ultrasonografía para el estudio de influencias genéticas en el desarrollo embrionario del ratón.

Esta hipótesis fue confirmada por los resultados obtenidos en los Experimentos 3 y 4; la aplicación de la ultrasonografía convencional para el estudio de la gestación en hembras problemáticas, usando como modelo experimental la línea *Nos3-KO*, ha permitido determinar que la aparición de pérdidas embrionarias y de retrasos en el desarrollo del resto de las crías se encuentra en dos momentos coincidentes, y muy concretos de la gestación. Concretamente, en el periodo en que se establece el proceso de gastrulación y se produce el desarrollo del primordio cardíaco y la circulación embrio-placentaria y, posteriormente, en el periodo de transición entre los estadios de embrión tardío y feto temprano, en que finaliza la organogénesis y se inicia la osificación y el crecimiento terminal.

Los resultados del Experimento 4 demostraron la importancia de los seguimientos ecográficos en días consecutivos, que permiten establecer no sólo las curvas de crecimiento embrionario y fetal, sino el crecimiento relativo del embrión y sus membranas. Esta valoración permite diferenciar procesos de retardo en el crecimiento, de procesos como pre-eclampsia, hidroamnios e hidroalantoides; asimismo, permite establecer el tipo de retardo en el crecimiento (simétrico en factores genéticos e infecciosos y asimétrico en nutricionales y alteraciones placentarias como pre-eclampsia).

El problema de las sondas de ultrasonografía convencionales, como se ha señalado anteriormente, es que sólo ofrecen una resolución espacial del orden de milímetros; resolución adecuada para un estudio general del embrión, pero insuficiente para visualizar en detalle los procesos celulares que acontecen durante la organogénesis y, especialmente, en los periodos críticos identificados.

Por ello, el tercer objetivo de esta memoria de Tesis, desarrollado en el Experimento 5, fue la valoración de la utilidad de la Ultrasonografía Biomicroscópica (UBM) para la realización, *in vivo*, de estudios dinámicos secuenciales de los cambios fenotípicos del embrión en el ratón, desde el momento de la implantación al final de la organogénesis. Hipótesis que fue confirmada por los resultados obtenidos, en que se obtuvieron imágenes equivalentes a las descritas previamente en estudios histológicos convencionales desde el Día 4,5 pc, en que se produce la implantación, hasta el final de la organogénesis.

Pero, además, la UBM permite estudios seriados con datos de dinámica de desarrollo. Por ello, las imágenes obtenidas resultaron ser excelentes para estudios secuenciales en la mayoría de los órganos y sistemas de interés en morfogénesis, como el sistema nervioso central, esquelético, digestivo y cardiovascular o la circulación feto-placentaria. Una ventaja adicional, de nuevo, es la posibilidad de realizar sesiones de UBM sin anestesia y con un nivel de estrés mínimo, teniendo en cuenta la posibilidad de grabar las imágenes y visualizar posteriormente las secuencias, tras liberar al animal.

Sin embargo, la UBM presenta como inconveniente, además de su elevado coste, su reducida área de exploración, que impide una valoración adecuada del útero completo en la hembra gestante. Por ello, la UBM se postula como técnica adecuada para la realización de observaciones muy concretas a nivel microscópico, mientras que la ultrasonografía convencional es más adecuada para el diagnóstico de gestación y la

determinación del tamaño de la camada en el manejo rutinario de una colonia o para la realización de estudios de mortalidad o desarrollo embrionario.





## 5. CONCLUSIONES



1. La ultrasonografía convencional con sondas de 10 MHz es el procedimiento de elección, entre las diferentes técnicas de imagen *in vivo*, para el diagnóstico de gestación y la determinación del número de fetos en ratón; pudiendo realizarse desde estadios peri-implantacionales.
2. El uso de la ultrasonografía convencional es adecuado para establecer la cronología de aparición y las medidas de diferentes órganos y estructuras embrionarias y fetales durante los distintos estadios de gestación en ratón. Entre las medidas realizadas, aquellas más sencillas de obtener y de mayor correlación con la edad gestacional fueron el diámetro de la vesícula, la longitud cráneo-caudal, el diámetro del tronco, la longitud occipito-nasal y el diámetro biparietal.
3. El estudio ultrasonográfico de cambios fenotípicos durante la gestación permite la valoración de alteraciones en el desarrollo y malformaciones congénitas en fetos vivos. Su aplicación en hembras con problemas reproductivos ha permitido determinar que la aparición de pérdidas embrionarias y de retrasos en el desarrollo de las crías se establecen, principalmente, en el periodo de gastrulación e inicio del primordio cardíaco y de la circulación embrio-placentaria y en el periodo de transición entre los estadios de embrión tardío y feto temprano.
4. La ultrasonografía convencional es, sin embargo, insuficiente para estudios detallados de embriogénesis a nivel microscópico.
5. La observación mediante ultrasonografía biomicroscópica, con sondas de 40 MHz, constituye una técnica adecuada para visualizar a nivel microscópico, *in vivo* y en tiempo real, el desarrollo embrionario en el ratón.
6. La observación con ultrasonografía, tanto convencional como biomicroscópica, puede realizarse sin anestesia ni depilación del animal y ser utilizada como una técnica no invasiva alternativa a la palpación abdominal, laparotomía y otras técnicas de imagen; su breve tiempo de observación (4-5 minutos) favorece el bienestar animal, minimiza el estrés y evita posibles efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo pre- y post-natal.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABRAMOWICZ, J.S.; BARNETT, S.B.; DUCK, F.A.; EDMONDS, P.D.; HYNYNEN, P.H.; ZISKIN, M.C. 2008.

Fetal Thermal Effects of Diagnostic Ultrasound. *J Ultrasound Med* 27: 541-559.

AHRENS, ET.; SRINIVAS, M.; CAPUANO, S.; SIMHAN, HN.; SCHATTEN, GP. 2006.

Magnetic resonance imaging of embryonic and fetal development in model systems. *Methods Mol Med* 124: 87-101.

ANTHONY, RV.; SCHEAFFER, AN.; WRIGHT, CD.; REGNAULT, TR. 2003.

Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl* 61: 183-194.

ARISTIZABAL, O.; KETTERLING, JA.; TURNBULL, DH. 2006.

40-MHz Annular Array Imaging of Mouse Embryos. *Ultrasound Med Biol* 32: 1631–1637.

ARROYO, JA.; ANTHONY, RV.; PARKER, TA.; GALAN, HL. 2006.

Differential expression of placental and vascular endothelial nitric oxide synthase in an ovine model of fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 195: 771-777.

BARKER, DJP. 1998.

Mothers, Babies and Health in Later Life. 2nd Edn. London: Churchill Livingstone,

BAYLIS, C.; BEINDER, E.; SUTO, T.; AUGUST, P. 1998.

Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin Nephrol* 18: 208–230.

BLOOMFIELD, FH.; OLIVER, MH.; HAWKINS, P.; CAMPBELL, M.; PHILLIPS, DJ.; GLUCKMAN, PD.; CHALLIS, JRG.; HARDING, JE. 2003.

A periconceptional nutritional origin for noninfectious preterm birth. *Science* 300: 606.

BOUCHER, DM.; PEDERSEN, RA. 1996.

Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reprod Fertil Dev* 8: 765-777.

BROWN, SD.; ZURAKOWSKI, D.; RODRIGUEZ, DP.; DUNNING, PS.; HURLEY, RJ.; TAYLOR, GA. 2006.

Ultrasound Diagnosis of Mouse Pregnancy and Gestational Staging. *Comparative Medicine* 56: 262-271.



BUHIMSCHI, IA.; SAADE, GR.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, RE.; 1998.

The nitric oxide pathway in preeclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 4: 25–42.

CHAI, Y.; MAXSON, RE. JR. 2006.

Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 235: 2353-2375.

CHAPON, C.; FRANCONI, F.; ROUX, J.; MARESCAUX, L.; LE JEUNE, JJ.; LEMAIRE, L. 2002.

In utero time-course assessment of mouse embryo development using high-resolution magnetic resonance imaging. *Anat Embryol* 206: 131–137.

CHEN, L. T.; HSU, Y. C. 1982.

Development of mouse embryos in vitro: preimplantation to the limb bud stage. *Science* 218: 66-68.

DHENAIN, M.; RUFFINS, SW.; JACOBS, RE. 2001.

Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Developm Biol* 232: 458–470.

DRESSLER, GR. 2006.

The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 509-29.

DUBOULE, D.; TARCHINI, B.; ZAKANY, J.; KMITA, M. 2007.

Tinkering with constraints in the evolution of the vertebrate limb anterior-posterior polarity. *Novartis Found Symp.* 284:130-7.

DUPIN, E.; CREUZET, S.; LE DOUARIN, NM. 2006.

The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv Exp Med Biol.* 589:96-119.

EDWARDS, LJ.; MCMILLEN, IC. 2002.

Impact of maternal undernutrition during periconceptional period, fetal number, and fetal sex development of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod* 66: 1562-1569.

EVANS, HE.; SACK, WO. 1973.

Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anat Histol Embryol* 2: 11–45.

FLAMME, I.; FROLICH, T.; RISAU, W. 1997.

Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173: 206–210.

FLIS, SA.; WATTIAUX, MA. 2005.

Effects of parity and supply of rumen-degraded and undegraded protein on production and nitrogen balance in Holsteins. *J Dairy Sci* 88: 2096–2106.

FOSTER, FS.; PAVLIN, CJ.; HARASIEWICZ, KA.; CHRISTOPHER, DA.; TURNBULL, DH. 2000.

Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound Med Biol* 26, 1–27.

FOSTER, FS.; ZHANG, M.; DUCKETT, AS.; CUCEVIC, V.; PAVLIN, CJ. 2003.

In vivo imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Investigative Ophthalmology & Vis Sci* 44, 2361–2366.

FOSTER, FS.; ZHANG, MY.; ZHOU, YQ.; LIU, G.; MEHI, J.; CHERIN, E.; HARASIEWICZ, KA.; STARKOSKI, BG.; ZAN, L.; KNAPIK, DA.; ADAMSON, SL. 2002.

A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol* 28, 1165–1172.

FOSTER, HL. 1983.

The mouse in Biomedical Research. Vol 3. (Embryology), London, UK; Academic Press.

GAGIOTI, S.; COLEPICILO, P.; BEVILACQUA, E. 1996.

Reactive oxygen species and phagocytosis process of hemochorial trophoblast. *J Braz Assoc Adv* 48: 37–42.

GAGIOTI, S.; SCAVONE, C.; BEVILACQUA, E. 2000.

Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod* 62: 260–268.

GARDNER, DS.; BUTTERY, PJ.; DANIEL, Z.; SYMONDS, ME. 2007.

Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction* 106: 307-312.

GARDNER, DS.; PEARCE, S.; DANDREA, J.; WALKER, RM.; RAMSEY, MM.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, ME. 2004.

Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension* 43: 1290-1296.

GARDNER, DS.; VAN BON, BWM.; DANDREA, J.; GODDARD, PJ.; MAY, SF.; WILSON, V.; STEPHENSON, T.; SYMONDS, ME. 2006.

Effect of periconceptional undernutrition and gender on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in young adult sheep *J Endocrinol* 190: 203-212.

GOPALAKRISHNAN, GS.; GARDNER, DS.; DANDREA, J.; LANGLEY-EVANS, SC.; PEARCE S; KURLAK LO; WALKER RM; SEETHO IW; KEISLER DH; RAMSAY MM; STEPHENSON T; SYMONDS ME.2005.

Influence of maternal pre-pregnancy body composition and diet during early-mid pregnancy on cardiovascular function and nephron number in juvenile sheep. *Br J Nutr* 94: 938-947.

GOUGE, RC.; MARSHBURN, P.; GORDON, BE.; NUNLEY, W.; HUET-HUDSON, YM. 1998.

Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod.* 58: 875-879.

GREENWOOD, PL.; BELL, AW. 2003.

Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl* 61: 195-206.

GREGG, RA. 2003.

Mouse models and the role of nitric oxide in reproduction. *Curr Pharm Des* 9: 391-398.

HARDING, JE. 2001.

The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Intern J Epidemiol* 30: 15-23.

- HEFLER, LA.; REYES, CA.; O'BRIEN, WE.; GREGG, AR. 2001.  
Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 64: 666–673.
- HOGERS, B.; GROSS, D.; LEHMANN, V.; ZICK, K.; DE GROOT, HJ.; GITTENBERGER-DE GROOT, AC.; POELMANN, RE. 2000.  
Magnetic resonance microscopy of mouse embryos in utero. *Anat Rec* 260: 373-377.
- HUANG, PL.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, KD.; MOSKOWITZ, MA.; BEVAN, JA.; FISHMAN, MC. 1995.  
Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.
- JACOBS, R.E.; FRASER, S. E. 1994.  
Magnetic resonance microscopy of embryonic cell lineages and movement. *Science* 263, 681–684.
- JI, RP.; PHOON, CKL.; ARISTIZÁBAL, O.; MCGRATH, KE.; PALIS, J.; TURNBULL DH. 2003.  
Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ Res* 92: 133-135.
- KAUFMAN, MH. 1989.  
Atlas of Mouse Development. London, UK; Academic Press Ltd.
- KLEEMAN, DO.; SMITH, DH.; WALKER, SK.; SEAMARK, RF. 1987.  
A study of real-time ultrasonography for predicting ovine foetal growth under field conditions. *Aust Vet J* 64: 352–353.
- KULANDAVELU, S.; QU, D.; SUNN, N.; MU J, RENNIE MY, WHITELEY KJ, WALLS JR, BOCK NA, SUN JC, COVELLI A, SLED JG, ADAMSON SL. . 2006  
Embryonic and neonatal phenotyping of genetically engineered mice. *ILAR J* 47: 103-117.
- LEVINE, AJ.; BRIVANLOU, AH. 2007.  
Proposal of a model of mammalian neural induction. *Dev Biol* 308: 247-256.

LICKERT, H.; TAKEUCHI, JK.; VON, B.I.; WALLS, JR.; MCAULIFFE, F.; ADAMSON, SL.; HENKELMAN, RM.; WRANA, JL.; ROSSANT, J.; BRUNEAU, BG. 2004.

Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 432: 107-112.

LONGO, M.; JAIN, V.; VEDERNIKOV, Y.; SAADE, GR.; GARFIELD, RE. 2001.

On fetal origin of disease: effect of in utero environment and genetic imprinting on future vascular reactivity [abstract]. *Am J Obstet Gynecol* 185(6 Suppl): S70.

LONGO, M.; JAIN, V.; ANDERSON, G.; VEDERNIKOV, Y.; GARFIELD, RE.; SAADE, GR. 2002.

Effect of in utero environment and genetic imprinting on future vascular reactivity in transgenic mice lacking a functional endothelial nitric oxide synthase [abstract]. *Am J Obstet Gynecol*. 186: S19.

LONGO, M.; JAIN, V.; LANGENVELD, J.; VEDERNIKOV, YP.; GARFIELD, RE.; HANKINS, GD.; ANDERSON, GD.; SAADE, GR. 2004.

Enhanced growth and improved vascular function in offspring from successive pregnancies in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Obstet Gynecol*. 191: 1470e6.

LOWENSTEIN, CJ.; DINERMAN, JL.; SNYDER, SH. 1994

Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 120: 227-237.

MAEDA, Y.; DAVÉ, V.; WHITSETT, JA. 2007.

Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 87: 219-244.

MARDON, H.; GREWAL, S.; MILLS, K. 2007.

Experimental models for investigating implantation of the human embryo. *Semin Reprod Med* 25: 410-417.

MARSHALL, E. 2000.

The rise of the mouse: biomedicine's model mammal. *Science* 288: 248-257.

MARTIN, GB.; RODGER, J.; BLACHE, D. 2004.

Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16: 491-501.

MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, GR.; GARFIELD, RE. 2003.

Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.* 9: 359-380.

MASHIMO, H.; GOYAL, RK. 1999.

Lessons from genetically engineered animal models IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 277: 745-750.

MAZZE, RI.; WILSON, AI.; RICE, SA.; BADEN, JM. 1985.

Fetal 241 development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* 32: 339-345.

MONCADA, S.; PALMER, RM.; HIGGS, EA. 1991.

Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

NANAEV, A.; CHWALISZ, K.; FRANK, H.G.; KOHNEN, G.; HEGELE-HARTUNG, C.; KAUFMANN, P. 1995.

Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res.* 282: 407-421.

OLIVER, MH.; HAWKINS, P.; HARDING, JE. 2005.

Periconceptional undernutrition alters growth trajectory and metabolic and endocrine responses to fasting in late-gestational fetal sheep. *Pediatric Res* 57: 591-598.

OTIS, EM.; BRENT, R. 1954.

Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec.* 120: 33-63.

PADMANABHAN, R.; ABDULRAZZAQ, YM.; BASTAKI, SM.; SHAFIULLAH, MM. 2008.

Intrauterine growth restriction and skeletal variations in mouse fetuses induced by vigabatrin administered at preimplantation stages of development. *Congenit Anom (Kyoto)* 48: 29-39.

PAVIA, CS. 1983.

Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. *J Infect Dis* 147: 1006–1010.

PHOON, CKL.; ARISTIZABAL, O.; TURNBULL, DH. 2000.

40 MHz Doppler characterization of umbilical and dorsal aortic blood flow in the early mouse embryo. *Ultrasound Med Biol* 26:1275-1283.

PHOON, CKL.; JI, RP.; ARISTIZÁBAL, O.; WORRAD, DM.; ZHOU, B.; BALDWIN, HS.; TURNBULL, DH. 2004.

Embryonic heart failure in NFATc1<sup>-/-</sup> mice. Novel mechanistic insights from in utero ultrasound biomicroscopy. *Circ Res* 95:92-99.

PHOON, CKL.; TURNBULL, DH. 2003.

Ultrasound biomicroscopy-Doppler in mouse cardiovascular development. *Physiol Genomics* 14:3-15.

PIELES, G.; GEYER, SH.; SZUMSKA, D.; SCHNEIDER, J.; NEUBAUER, S.; CLARKE, K.; DORFMEISTER, K.; FRANKLYN, A.; BROWN, SD.; BHATTACHARYA, S.; WENINGER, WJ. 2007.

MicroMRI-HREM pipeline for high-throughput, high-resolution phenotyping of murine embryos *J Anat* 211: 132-7.

PURCELL, TL.; GIVEN, R.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, RE. 1999.

Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Human Reprod*. 5: 467-475.

RAO, S.; OVCHINNIKOV, N.; MCRAE, A. 2006.

Gestational stage sensitivity to ultrasound effect on postnatal growth and development of mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76: 602-608.

RICHARDSON, C. 1976.

Morphological parameters of intrauterine growth retardation in the newborn lamb. *Vet. Record* 101: 151-152.

RUSSELL, WM. 1995.

The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim* 23, 298-304.

RUSSO, M.; MEOMARTINO, L.; GRECO, A.; CATONE, G.; COCCHIA, N.; TORTORA, G.; BRUNETTI, A. 2007.

Pregnancy detection in mice using ultrasound. *Vet Record* 160: 446-447.

SAKADZIC, S.; WANG, LV. 2004.

High-resolution ultrasound-modulated optical tomography in biological tissues. *Optics Letters* 29: 2770-2772.

SCHILESINGER, M.; KOREN Z. 1975.

Mouse trophoblast cells in tissue culture. *Fertil Steril* 18: 95-101.

SCHNEIDER, JE.; BAMFORTH, SD.; FARTHING, CR.; CLARKE, K.; NEUBAUER, S.; BHATTACHARYA, S. 2003.

High-resolution imaging of normal anatomy, and neural and adrenal malformations in mouse embryos using magnetic resonance microscopy *J Anat* 202: 239-247.

SMITH, BR.; JOHNSON, GA.; GROMAN, EV.; LINNEY, E. 1994.

Magnetic resonance microscopy of mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 3530-3533.

SPURNEY, CF.; LO, CW.; LEATHERBURY, L. 2006.

Fetal mouse imaging using echocardiography: a review of current technology. *Echocardiography* 23: 891-899.

STEPHENSON, SK.; LAMBOURNE, LJ. 1960.

Prenatal growth in Romney X Southdown cross and Australian Merino sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 2: 1044-1063.

STRATMEYER, M.E.; GREENLEAF, J.F.; DALECKI, D.; SALVESEN, K.A. 2008.

Fetal Ultrasound: Mechanical Effects. *J Ultrasound Med* 27: 597-605.

STYPMANN, J. 2007.

Doppler ultrasound in mice. *Echocardiography* 24: 97-112.

SYMONDS, ME.; STEPHENSON, T.; GARDNER, DS.; BUDGE, H. 2007.

Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. *Reprod Fertil Develop* 19: 53-63.

TAILLIEU, F.; SALOMON, LJ.; SIAUVE, N. 2006.

Placental perfusion and permeability: simultaneous assessment with dual-echo contrast-enhanced MR imaging in mice. *Radiology* 241: 737-745.



TEDESCO, RC.; VITOR, RW.; BRANDÃO, GP.; CALABRESE, KS. 2007.  
Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. *Micron* 38: 729-833.

THALER, CD.; EPEL, D. 2003.  
Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des* 9: 399-409.

THEILER, K. 1989.  
The house mouse: atlas of embryonic development. Springer-Verlag, New York.

VAN DER HEIJDEN, OW.; ESSERS, YP.; FAZZI, G.; PEETERS, LL.; DE MEY, JG.; VAN EYS, GJ. 2005.  
Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 72: 1161–1168.

VEDERNIKOV, Y.; SAADE, GR.; GARFIELD, RE. 1999.  
Vascular reactivity in preeclampsia. *Semin Perinatol* 23: 34–44.

WENHAM, G. 1981.  
A radiographic study of early skeletal development in foetal sheep. *J Agric Sci Camb* 96: 39–44.

WENHAM, G. 1981.  
A radiographic study of the changes in skeletal growth and development of the foetus caused by poor nutrition in the pregnant ewe. *Br Vet J* 137: 176–187.

XIAO, R; SORENSON, TK; WILLIAMS, MA; LUTHY DA. 2003.  
Influence of preeclampsia on fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 13: 145-146

YEH, B.M. 2006.  
Science to Practice: Has the Time Arrived to Image Placental Perfusion?. *Radiology* 241: 633–634.

ZHOU, Y.Q. ; FOSTER, F.S. ; PARKES, R. ; ADAMSON, S.L. 2003.  
Developmental changes in left and right ventricular diastolic filling patterns in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1563-H1575.

ZHOU, YQ.; FOSTER, FS.; QU, DW.; ZHANG, M.; HARASIEWICZ, KA.; ADAMSON, SL. 2002.

Applications for multifrequency ultrasound biomicroscopy in mice from implantation to adulthood. *Physiol Genomics* 10:113-126.

ZIEBELL, BT.; GALAN, HL.; ANTHONY, RV.; REGNAULT, TR.; PARKER, TA.; ARROYO, JA. 2007.

Ontogeny of endothelial nitric oxide synthase mRNA in an ovine model of fetal and placental growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 197: 420.e1-5.

ZORN, AM.; WELLS, JM. 2007.

Molecular basis of vertebrate endoderm development. *Int Rev Cytol* 259: 49-111.



**ANEXO 1. PUBLICACIONES DERIVADAS  
DE ESTA MEMORIA EXPERIMENTAL**



En el transcurso del desarrollo experimental de esta Memoria de Tesis se han elaborado, y enviado para su publicación, diferentes comunicaciones, ponencias y artículos científicos que reflejamos a continuación.

#### Ponencias Invitadas en Congresos

*In Vivo Imaging of Reproductive Features in Biomedicine Animal Models* (Antonio Gonzalez-Bulnes y Pilar Pallares), ponencia invitada que se presentará en el 16th International Congress on Animal Reproduction (Workshop 15, Animals as biomedical models in reproductive medicine). Budapest (Hungría), 13-17 Julio 2008.

#### Comunicaciones en Congresos

*Uso de la Ultrasonografía para el Diagnostico y Seguimiento de la Gestación en el Ratón* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). IX Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Córdoba (España), 20-23 Noviembre 2007.

#### Artículos Científicos.

1. *The Use of Ultrasound Imaging for Early Diagnosis of Pregnancy and Determination of Litter Size in the Mouse* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). Aceptado para su publicación en *Laboratory Animals*; se corresponde con el Experimento 1.
2. *Non-invasive Ultrasonographic Characterization of Phenotypic Changes during Embryo Development in Non-anesthetized Mice of different Genotypes* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En prensa en *Theriogenology*; se corresponde con el Experimento 2.
3. *Disruption of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene affect Ovulation, Fertilization and Early Embryo Survival in a Knockout Mouse Model* (Pilar Pallares, Rosa A. Garcia-Fernandez, Luis M. Criado, Claudia A. Letelier, David Esteban, Jose M. Fernandez-Toro, Juana M. Flores y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en *International Journal of Developmental Biology*; incluye datos relacionados con el Experimento 3.
4. *Intrauterine Growth Retardation in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice is Established from Early Stages of Pregnancy* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En prensa en *Biology of Reproduction*; se corresponde con el Experimento 4.
5. *In Vivo Virtual Histology of Mouse Embryogenesis by Ultrasound Biomicroscopy and Magnetic Resonance Imaging* (Pilar Pallares, María E. Fernandez-Valle y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en *Molecular Imaging and Biology*; incluye datos relacionados con actividades previas y el Experimento 5.



Ponencias invitadas en Congresos

*In Vivo Imaging of Reproductive Features in Biomedicine Animal Models* (Antonio Gonzalez-Bulnes y Pilar Pallares), ponencia invitada que se presentará en el 16th International Congress on Animal Reproduction (Workshop 15, Animals as biomedical models in reproductive medicine). Budapest (Hungría), 13-17 Julio 2008.





## **In vivo imaging of reproductive features in biomedicine animal models**

Gonzalez-Bulnes, A<sup>1,\*</sup> and Pallares, P<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Reproduccion Animal. INIA. Madrid, Spain

<sup>2</sup>Fundacion CNIC. Madrid, Spain

---

Animals have been used as experimental models in reproductive research from early studies. The variety of species is huge; including amphibians, fish, avian and mammalian primates and non-primates. Currently, most used models are based in rodents, sheep, swine and monkeys. First methods of study in these species were based in direct observation after necropsy or surgery. However, such techniques are invasive and impede successive dynamic studies on the same animals. These can be afforded by using non-invasive imaging methods; which also contribute to the improvement of animal conditions, reducing the number of experimental animals and refining the studies, in agreement with the philosophy of the 3Rs model of Russell and Burch. Moreover, when using animal models in biomedicine, studies may be essentially translational; this is facilitated to the top by the application the same diagnostic and observational techniques in experimental studies and clinical practice. These aims are reached by the use of imaging techniques like X-rays, Computed Tomography (CT, 3-D images from 2-D X-ray images taken around a single axis of rotation), Positron Emission Tomography (PET, 3-D images by detecting gamma rays produced by a positron-emitting radioisotope), Magnetic Resonance Imaging (MRI, by using magnetic fields and radio waves), Ultrasonography (US, by emission of sound waves with a frequency higher than 2 MHz which produces echoes of the body), Biomicroscopy (US at 40-70 MHz of frequency), Doppler US (US evaluating movement of scatterers, usually in blood, by changes in the echoes), Fluorescence (by tagging biological molecules with fluorescent chemicals or fluorophores) and Bioluminescence (by tagging biological molecules with luciferase). All these techniques have different advantages, disadvantages and limitations; so there is not a “supreme” imaging technique by itself. Most of them are technically complex, very expensive, not commonly available, and needing the animal to be anaesthetized, which limits serial studies in successive days. Thus, in many instances, ultrasound-based techniques are the imaging method of choice, because a) enable real-time viewing that cannot be obtained by any other method b) there is no secondary risk to animals, and c) are of moderate cost. Moreover, the usefulness of Doppler and grey-scale imaging has been significantly enhanced over the past decade by the improvement of ultrasound contrast agents, which are valuables not only for their diagnostic use, but also for therapeutic applications like targeted delivery of drugs.



## Comunicaciones en Congresos

*Uso de la Ultrasonografía para el Diagnostico y Seguimiento de la Gestación en el Ratón* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). IX Congreso de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Córdoba (España), 20-23 Noviembre 2007.



IX CONGRESO

SECAL

2007

Sociedad Española  
para las Ciencias del  
Animal de Laboratorio[www.congresosecalcordoba2007.com](http://www.congresosecalcordoba2007.com)

CAMPUS UNIVERSITARIO

DE RABANALES

CÓRDOBA

20 - 23 noviembre

**USO DE LA ULTRASONOGRAFIA PARA EL DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN EL RATON.**

P. Pallares Garcia; A. Gonzalez-Bulnes  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES  
CNIC: C/ MELCHOR FERNANDEZ ALMAGRO Nº 3  
28029 Madrid. Teléfono: 914531202  
E-mail: ppallares@cnic.es

**RESUMEN**

USO DE LA ULTRASONOGRAFIA PARA EL DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN EL RATON. Pilar Pallares<sup>1</sup> y Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>2</sup> <sup>1</sup>Unidad de Animalario. CNIC. Melchor Fernández Almagro 3. 28029-Madrid. <sup>2</sup>Dpto. Reproducción Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid. El presente trabajo valoró la utilidad de la ultrasonografía para la detección y evaluación rutinarias de la gestación en 46 hembras adultas de diferentes líneas (19 BALB/c, 15 C57BL/6 y 12 CD1) y utilizando diferentes tipos de sondas (lineal vs sectorial, 7,5 vs 10MHz); las mejores imágenes se obtuvieron con sondas lineales de 10MHZ. El examen tuvo una duración media de 5 minutos y fue realizado por inmovilización manual, sin anestesia. La primera imagen compatible con gestación fue obtenida, en 3 animales, en el Día 4,5 tras la cubrición; diferenciándose vesículas embrionarias, en todas las hembras, desde el Día 5,5. La eficiencia para la determinación del rango de la camada (menor de 5 crías, entre 5 y 10 y mayor de 10) fue del 100% desde el día 8,5. Las medidas de la vesícula embrionaria y la longitud craneo-caudal y el diámetro transversal del embrión se tomaron desde el Día 5,5; posteriormente, se determinaron los diámetros craneales (longitud occipito-nasal y diámetro biparietal). Todas estas mediciones estaban altamente correlacionadas con la edad fetal ( $P < 0.05$ ), y que los diámetros de la cabeza fueron mayores en C57BL/6 ( $P < 0.05$ ). La aplicación de la ultrasonografía supone una innovación en los métodos de trabajo, tanto de manejo como experimentales, en esta especie. En primer lugar, posibilita la separación y el manejo diferencial de animales gestantes y no gestantes; permitiendo disminuir el intervalo entre cubriciones en animales que presentaron un tapón vaginal infértil. Asimismo, permite planificar, entre otras actividades, el programa de partos, la aplicación de cesáreas o la preparación de nodrizas. Por otra parte, contribuye a la mejora de las condiciones de experimentación, favoreciendo su refinamiento y reducción. Refinamiento respecto tanto a técnicas invasivas o que necesitan anestesia como a la técnica de palpación. Reducción, ya que permite disminuir el número de animales por experimento, usando sólo animales con gestación y tamaño de camadas conocidos.

# USO DE LA ULTRASONOGRAFÍA PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE GESTACIÓN EN RATÓN




**PILAR PALLARÉS\*** y **ANTONIO GONZÁLEZ- BULNES\*\*** \*Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. CNIC. \*\*Dpto. Reproducción Animal INIA

---

## OBJETIVOS

**VALORACIÓN DE LA ULTRASONOGRAFÍA COMO MÉTODO NO INVASIVO EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA GESTACIÓN EN RATÓN**

**EVALUACIÓN DE SU UTILIDAD PARA LA REDUCCIÓN Y REFINAMIENTOS DE PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN ESTOS GESTACIONES**

**ANIMALES UTILIZADOS**

19 BALB/c 15 C57BL/6 12 CD-1 (ICR)

**EQUIPAMIENTO**

AIKKA5008SD. SONDA LINEAL 7.5MHZ

AIKKA25008SD. SONDA LINEAL 7.5-10MHZ

SIEMENS ANIMES SONDA SECTORIAL 7.5-10MHZ

*RESOLUCIÓN MAYOR CON SONDA LINEAL DE 10MHZ*

**CONDICIONES DE EXPLORACIÓN**

INMOVILIZACIÓN MANUAL, SIMPLICIDAD MANEJO

ANESTESIA INNECESARIA; SE EVITAN RIESGOS DERIVADOS

NO PRECISA DEPILACIÓN; SE EVITA RIESGO HIPOTÉRMICO

*TIEMPO MEDIO DE EXPLORACIÓN: 4 MINUTOS*

### 1.- DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

- Precocidad: 4,5 días post-coito
- Fiabilidad: 100% desde 5,5 días post-coito





Sonda sectorial 10MHz      Sonda lineal 10MHz

### 2.- DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FETOS

- Precocidad: 5,5 días post-coito
- Fiabilidad: 90%
- Mayor exactitud: 6,5-8,5 días post-coito.






Sonda lineal 7.5MHz      Sonda lineal 10MHz      Sonda sectorial 10MHz

### 3.- DIFERENCIACIÓN DE ORGANOS Y FETOMETRÍA





Corazón, Córdon U      EMBRÓN 105 pc      Cabeza, Tórax




Diámetro del tronco      Long. dorso-occipital





EMBRÓN 145 pc      Longitud occipito- nasal      Diámetro biparietal

**AGRADECIMIENTOS:** AILBINE SANCHEZ SANCHEZ POR SU AYUDA Y COLABORACIÓN EN EL ANÁLISIS DE DATOS. ANA VILLALBA GARCÍA POR SU AYUDA EN LA REDACCIÓN DEL MANUSCRITO.







## Artículos Científicos

*The Use of Ultrasound Imaging for Early Diagnosis of Pregnancy and Determination of Litter Size in the Mouse* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). Aceptado para su publicación en *Laboratory Animals*; se corresponde con el Experimento 1.



## Laboratory Animals

Laboratory Animals  
The Royal Society of Medicine Press Limited



The use of ultrasound imaging for early diagnosis of pregnancy and  
determination of litter size in the mouse

Journal:	<i>Laboratory Animals</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pallares, Pilar; CNIC Gonzalez-Bulnes, Antonio; INIA, Reproduccion Animal
Keywords:	Reproduction &lt; PHYSIOLOGY, Diagnostic assay &lt; TECHNIQUES, Handling techniques &lt; TECHNIQUES, 3Rs &lt; ETHICS & WELFARE
Note: The following files were submitted by the author for peer review, but marked to be sent in Off-Line.	
authors proforma	



ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901



## The use of ultrasound imaging for early diagnosis of pregnancy and determination of litter size in the mouse

Pilar Pallares<sup>1</sup> and Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Melchor Fernandez Almagro 3. 28029-Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Dpto. de Reproduccion Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid, Spain.

---

### Abstract

Precocity and efficiency of ultrasonography for pregnancy diagnosis and determination of litter size in mice was evaluated in current study, by assessing a total of 46 adult mice of different strains (19 BALB/c, 15 C57BL/6 and 12 CD1) from Day 4.5 after vaginal plug. Different commercial ultrasound machines and probes (linear vs sectorial; 7.5 vs 10MHz) were contrasted; the best images being obtained by the use of 10MHz linear transducers. The first visualization congruent with pregnancy, specifically with the implantation sites, was achieved at Day 4.5 in three animals. Presence of embryonic vesicles was differentiated at Day 5.5 in all the females; the embryos and remaining gestational structures inside the vesicles were clearly distinguished from Day 8.5. Data were validated not only after delivery, but also by comparison with post-mortem findings in crucial days (Days 4.5 and 8.5). The efficiency for counting the exact number of embryos was very low, due to underestimation in highly prolific females. Conversely, the evaluation of the range of conceptuses, instead of the total number, was more accurate; sensitivity, specificity and total efficiency reaching 100% from Day 8.5. Thus, ultrasonography can be accurately used as an alternative non-invasive technique for pregnancy diagnosis and determination of litter-size in the mouse from very early stages of gestation, replacing other procedures currently used and increasing efficiency in animal management and research.

*Keywords:* Litter-size, Mouse, Pregnancy-diagnosis, Ultrasonography.

---

Corresponding author: Pilar Pallares. Phone: 00 34 91 453 12 02. FAX: 0034 91 453 12 65.  
E-mail: ppallares@cnic.es (P. Pallares)

### Introduction

The mouse is widely used for research purposes worldwide (Foster, 1983; Marshall, 2000). Control and planning of reproduction, either for management in the animal units or for experimental purposes in the research units, is routinely used. Thus, the possibility of establishing a non-invasive, reliable and early method for pregnancy diagnosis, differentiating between pregnant and non-pregnant animals and determining the number of conceptuses, is crucial. Assessment of pregnancy in mice is usually made by direct observation after laparotomy or by abdominal palpation (Foster, 1983). The first impedes progression of pregnancy; the reliability of the second method depends on the ability of the operator, while its precocity is not earlier than 12-14 days of gestation, depending on litter size (Kaufman, 1989).

Diagnosis of pregnancy and determination of litter size is routinely established, both in humans and other animal species, by real-time ultrasound imaging. The ultrasonography is

widely recognized as a reliable non-invasive method for the diagnosis of pregnancy and the study of its normal progression. Its application to mice would be beneficial for the management of both the general population and experimental groups in research centers. Moreover, it would contribute to the improvement of animal conditions in research, in agreement with the philosophy of the 3Rs model of Russell and Burch (refinement, reduction and replacement; Russell, 1995). The possibility of non-invasive pregnancy diagnosis would reduce the number of experimental animals and would refine the studies, using only pregnant animals with a known litter size. However, the use of ultrasonography in the mouse has been limited to several studies using ultrasound microscopy (Foster et al., 2000, 2002, 2003), with probes between 40-70 MHz of frequency, which are technically complex, very expensive and not commonly available. The use of lower frequency (15MHz) for pregnancy assessment in mice has been described only very recently (Brown et al., 2006); commercial probes usually have a maximum of 10-11MHz, frequency only used in a study published during the developmental of our work (Russo et al., 2007). However, both foremost works started after the first week of pregnancy and, thus, a serial study of the precocity of ultrasound diagnosis and its reliability were not analyzed.

Therefore, the objective of current study was to determine precocity and accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis and determination of number of conceptuses in mice; using different commercial ultrasound machines and probes, in different mice strains used in research (BALB/c, C57BL/6 and CD1). The quality of the ultrasound imaging is depending on the transducer used (type and frequency). In brief, linear probes offer a better image resolution but need a larger area for exploration, whilst sectorial probes are very adequate for small animals. On the other hand, resolution is higher when using higher frequencies, but the price of the equipment is also increased. Thus, we have compared different linear and sectorial probes varying from 7.5 to 10 MHz of frequency. Results were validated both by assessment of the deliveries and by comparison with macroscopic findings.

## Material and methods

### *Animals*

The study was performed using of 46 adult mice in breeding age of different strains (19 BALB/c, 15 C57BL/6 and 12 CD1). All the animals were maintained at the facilities of the CNIC Animal Laboratory Unit in Madrid, Spain, which meets the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. The experiment was carried out under Project License 156/07 from the CNIC Scientific Ethic Committee and animal manipulations were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 about the protection of animals used in experimentation.

### *Ultrasonographic study*

The females used in the trial were individually placed with males until the morning of the day in which a vaginal plug was found as result of overnight mating. This was considered Day 0.5 for estimation of gestational age; ultrasound observations started at Day 3.5 (reported to be the day of embryo implantation; Kaufman, 1989). For examination, the mice were manually restrained in dorsal recumbence. Anesthesia was avoided for preventing any effect on pregnancy (Mazze et al., 1985). In order to diminish animal distress, abdominal hair was not clipped; the presence of air between the skin and the transducer, which makes the quality of the images worse, was avoided by abundantly wetting the abdomen with gel.

Observations were performed using 3 different ultrasound machines; an Aloka 500 SSD fitted to a 7.5 MHz linear array transducer (Aloka Co., Tokyo, Japan), an Aloka 2500 equipped with a multifrequency (7.5-10 MHz) sectorial array probe (Aloka Co., Tokyo, Japan) and a Siemens Acuson Antares connected to a multifrequency (7.5-10 MHz) linear array probe (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). Ultrasound scanning was done by placing the transducer on the abdominal wall and moving it in different directions for viewing the uterine horns and their content; when presence of gestational structures were determined, the number of embryos/fetuses was determined by placing the transducer in one side of the abdomen and moving it to the opposite.

#### *Validation of the technique*

The accuracy for very early pregnancy diagnosis was validated in 2 animals that, after ultrasound scanning, were anesthetized with isoflurane vapors and killed by cervical dislocation at Days 4.5 and 8.5 days of pregnancy. The genital tracts were immediately removed for checking number and characteristics of gestational structures in the uteri.

#### *Data analysis*

Data on pregnancy diagnosis and number of conceptuses were grouped according to the day of gestation and compared to those obtained at delivery for determining the accuracy or predictive value of ultrasonography. Accuracy for determination of litter size was determined both for the total number of embryos and for different ranges (less than 5, between 5 and 10 more than 10). Predictive values for both pregnancy diagnosis and litter size were established in terms of sensitivity (percentage of mice correctly diagnosed as pregnant and percentage of females correctly diagnosed as having a certain number/range of conceptuses, respectively), specificity (percentage of mice correctly diagnosed as non pregnant or not having a certain number/range of embryos) and total efficiency (total percentage of individuals correctly classified as pregnant or not and total percentage of mice having a certain number/range of conceptuses or not). Relationship between predictive values and gestational age was assessed by Pearson correlation procedures, considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ .

### **Results**

The first visualization congruent with pregnancy, specifically with the implantation sites, was achieved at Day 4.5 in three different mice, one of every strain, by using both the 10MHz linear and sectorial transducers (Figure 1); the scanning with 7.5 MHz was impeded by the scarce amount of amniotic fluid in the embryonic vesicle, which made difficult to distinguish the uterine horns within the abdominal content. Thereafter, using 10MHz, presence of embryonic vesicles, and embryo inside, was differentiated at Day 5.5 in all the animals (Figure 2). The embryo and remaining gestational structures were clearly distinguished from Day 8.5 (Figure 3); while their viability could be determined by assessing heart beats from Day 9.5. In later stages of pregnancy, it is possible to differentiate phenotypical characteristics and to evaluate normality or abnormality in fetal development (Figure 4).

The number of embryos could be determined from Day 6.5; but the efficiency for counting the exact number was very low, due to underestimation in highly prolific females. The evaluation of the range of conceptuses, instead of the total number, was more accurate; sensitivity, specificity and total efficiency reaching 100% from Day 8.5 (Figure 5).



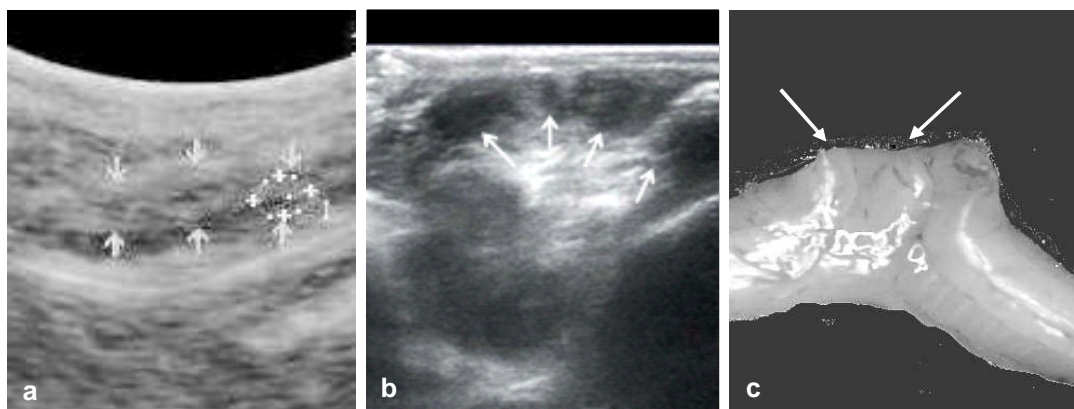


Figure 1. Visualization of implantation sites in mice at Day 4.5 post-coitum (marked by arrows). Ultrasonographic images obtained with 10MHz sectorial (a) and linear probes (b), and macroscopic finding (c).

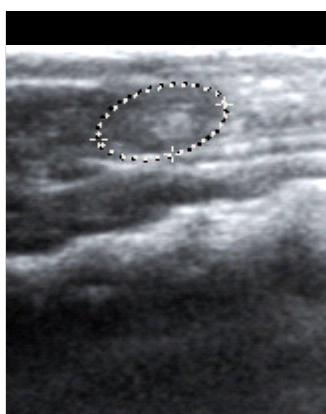


Figure 2. Determination of gestation by ultrasound imaging of embryonic vesicles in mice at Day 5.5 post-coitum.

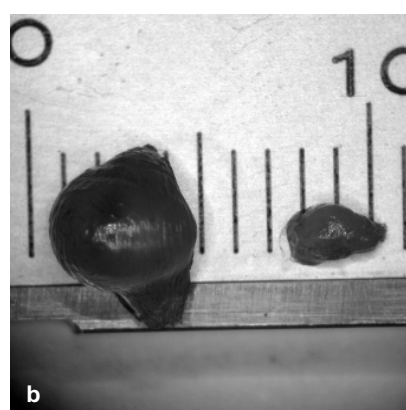
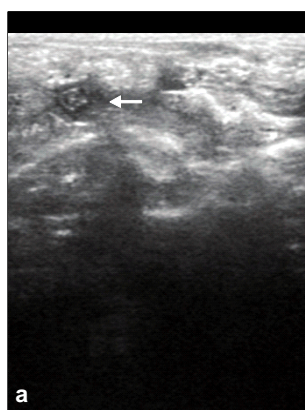


Figure 3. Ultrasonography of the mouse gestational sac and embryo inside (a, white arrow) and macroscopic image of vesicle and embryo (b) at Day 8.5 post-coitum.

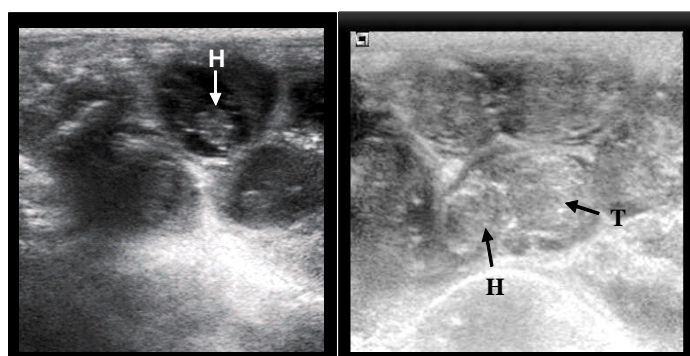


Figure 4. Ultrasonographic images of mouse embryos at Day 12.5 (left hand) and 14.5 (right hand) of pregnancy (H: head, T: trunk).

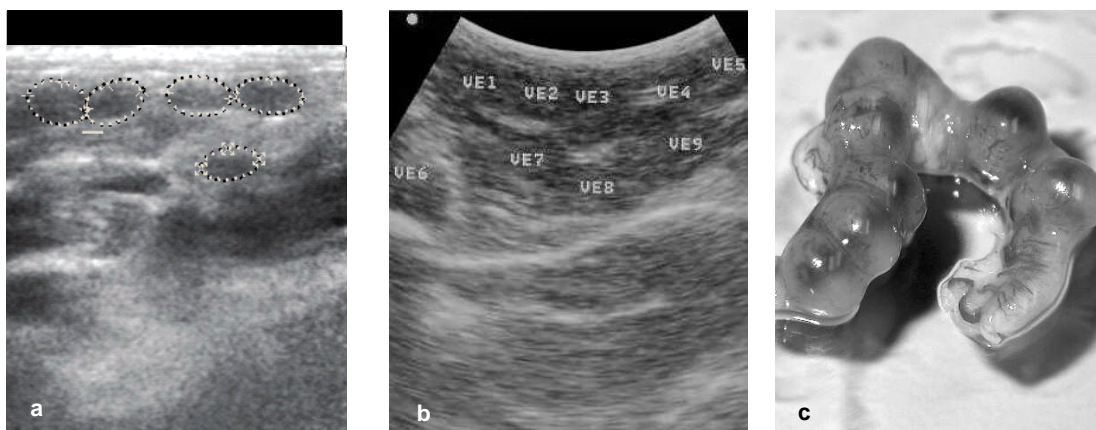


Figure 5. Determination of litter size in mice at Day 8.5 post-coitum. Ultrasonographic images obtained with 10MHz linear (a) and sectorial probes (b), and macroscopic finding (c).

## Discussion

This study shows the suitability of abdominal ultrasonography for early pregnancy diagnosis in mice, with a precocity of 4.5 days after vaginal plug and an efficiency of 100% from Day 5.5 p.c. when using a probe with 10MHz of frequency. The precocity and reliability were limited when using a transducer with 7.5MHz; whilst the quality of the images was improved when using linear probe. The efficiency of ultrasonography is, thus, higher than by abdominal palpation (Foster, 1983); like precocity, estimated around 12 days of gestation for palpation, depending on litter size and ability of the operator (Kaufman, 1989). The results from current trial report, to our knowledge, the highest precocity for pregnancy diagnosis in mice, just after implantation. The previous ultrasonographic studies of Russo et al., (2007) and Brown et al., (2006) started at Days 7.5 and 9.5, respectively; however, both reported measurement from their first day of observation, so an earlier detection could not be discarded. Efficiency of ultrasonographic examination for determination of the exact number of conceptuses was very low, but adequate for the range of litter; higher, anyway, than with palpation and adequate for management of experimental groups.

The exam for pregnancy diagnosis and determination of litter-size was easy to perform, being not necessary the use of anesthesia or abdominal clipping, which is useful for favoring the animal wellbeing; moreover, the use of anesthesia may alter further development of pregnancy (Mazze et al., 1985). The time elapsed for the examination avoid the induction of possible changes of ultrasound on pre- and post-natal growth and development; these effects have been reported with exposures higher than 30 minutes and with frequencies up to 3.5 MHz (Rao et al., 2006). Thus, the use of ultrasonography for pregnancy diagnosis keep with recommendations for refinement in animal experimentation (3Rs model of Russell and Burch; Russell, 1995), as an alternative to abdominal palpation, laparotomy and other techniques needing anesthesia. The second R (reduction) is also fulfilled by the use of ultrasound, avoiding the unwarranted use and, even, the sacrifice of non-pregnant females showing vaginal plugs after infertile coitus; this is particularly important when working with mice of modified genetic backgrounds, some of them bearing altered fertilization and gestation processes. The use of ultrasound diagnosis would be beneficial not only by reducing the number of experimental animals (ethical commitment), but also assuring an adequate number of animals for the consecution of the experimental objectives (competence commitment), since non-pregnant animals can be recycled or replaced for others, obtaining more homogeneous groups.

In conclusion, ultrasonography can be accurately used as an alternative non-invasive technique for pregnancy diagnosis and determination of litter size in the mouse from very early stages of gestation, replacing procedures currently used and increasing efficiency in animal management and research.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the expertise of Santiago Rodriguez and the staff of CNIC Animal Unit for skilled technical assistance. The help, providing different ultrasound machines and probes, from Ana Vidaurrezaga (Aloka España, Madrid, Spain) and Isaac Cisneros (RX Cisneros Electromedicina, Madrid, Spain) is deeply recognized. CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation; there were no other outside funding.

## References

- Brown SD, Zurakowski D, Rodriguez DP, Dunning PS, Hurley RJ, Taylor GA (2006) Ultrasound Diagnosis of Mouse Pregnancy and Gestational Staging. *Comparative Medicine* **56**, 262-271.
- Foster FS, Pavlin CJ, Harasiewicz KA, Christopher DA, Turnbull DH (2000) Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound in Medicine and Biology* **26**, 1–27.
- Foster FS, Zhang M, Duckett AS, Cucevic V, Pavlin CJ (2003) In vivo imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Investigation in Ophthalmology and Vision Science* **44**, 2361–2366.
- Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, Harasiewicz KA, Starkoski BG, Zan L, Knapik DA, Adamson SL (2002) A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound in Medicine and Biology* **28**, 1165–1172.
- Foster HL (1983) *The mouse in Biomedical Research. Vol 3. (Embryology)*, London, UK; Academic Press.
- Kaufman MH (1989) *Atlas of Mouse Development*. London, UK; Academic Press Ltd.
- Marshall E (2000) The rise of the mouse: biomedicine's model mammal. *Science* **288**, 248-257.
- Mazze RI, Wilson AI, Rice SA, Baden JM (1985) Fetal development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* **32**, 339-345.
- Rao S, Ovchinnikov N, McRae A (2006) Gestational stage sensitivity to ultrasound effect on postnatal growth and development of mice. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **76**, 602-608.
- Russell WM (1995) The development of the three Rs concept. *Alternatives to Laboratory Animals* **23**, 298-304.
- Russo M, Meomartino L, Greco A, Catone G, Cocchia N, Tortora G, Brunetti A (2007). Pregnancy detection in mice using ultrasound. *Veterinary Record* **160**, 446-447.





## Artículos Científicos

*Non-invasive Ultrasonographic Characterization of Phenotypic Changes during Embryo Development in Non-anesthetized Mice of different Genotypes* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). Aceptado para su publicación en *Theriogenology*; se corresponde con el Experimento 2.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Theriogenology

Theriogenology xxx (2008) xxx–xxx

[www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

# Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes

P. Pallares<sup>a,\*</sup>, A. Gonzalez-Bulnes<sup>b</sup><sup>a</sup> *Unidad de Animales, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain*<sup>b</sup> *Dept. Reproducción Animal, INA, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain*

Received 29 August 2007; received in revised form 14 February 2008; accepted 15 February 2008

## Abstract

This study aimed to determine phenotypic changes during embryo development in the mouse, and the influence of genetic background, by non-invasive real-time ultrasonography. Serial scanings were performed from Day 4.5 after the appearance of the vaginal plug in a total of 34 adult mice of different strains (9 BALB/c, 10 C57BL/6 and 15 CD1). Embryonic vesicle diameter was measurable from Day 4.5 of pregnancy. Images of embryos were obtainable from Day 5.5 of gestation onwards, and crown-rump length and trunk parameters (diameter and area) were measured. At more advanced stages, the positions of fetuses prevented accurate measurement of crown-rump length; therefore head diameters (occipito-snout length and the biparietal diameter) were used as an alternative index of fetal size. All measurements correlated highly with gestational age ( $P < 0.0005$ ). No significant differences were observed between genotypes in early pregnancy, but during the last week of gestation trunk measurements were larger in CD1 embryos ( $P < 0.05$ ) while head diameters were larger in C57BL/6 conceptuses ( $P < 0.05$ ). There was a significant effect of genetic background on heart rate throughout pregnancy; although heart rate was similar in CD1 and C57BL/6 embryos ( $154.5 \pm 2.8$  and  $147.8 \pm 4.5$  beats/min, respectively), it was significantly lower in BALB/c mice ( $127.0 \pm 2.1$ ;  $P < 0.005$  vs. CD1 and C57BL/6).

© 2008 Published by Elsevier Inc.

**Keywords:** Conceptus; Developmental biology; Early development; Pregnancy; Ultrasonography

## 1. Introduction

The mouse is a widely used model in biological research [1,2], and one of the major fields of study is developmental biology. However, analysis of the development of specific phenotypes, which is required for the progress of knowledge, is hindered by the fact

that most methodologies are invasive and impede the progression of pregnancy. The use of non-invasive methods has been previously described, for example magnetic resonance imaging [3–5] and ultrasound microscopy (probes between 40 and 70 MHz of frequency; [6–8]). However, these methods are technically complex, very expensive and not widely available. Moreover, they require that mice be anesthetized and immobilized, which prevents serial scanings on successive days.

A reliable non-invasive method for screening conceptus development would thus be very beneficial

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 453 12 02; fax: +34 91 453 12 65.

E-mail address: [ppallares@cnic.es](mailto:ppallares@cnic.es) (P. Pallares).



for research in developmental biology, by allowing examination on successive days, minimizing animal management, and avoiding the use of anesthesia and invasive techniques. Furthermore, it would contribute to the improvement of animal welfare, in accordance with the philosophy of the 3Rs model of Russell and Burch (refinement, reduction and replacement; [9]). Non-invasive techniques would reduce the number of experimental animals used and make studies more precise, by ensuring that only pregnant animals of known gestational age are used. The ability to determine gestational age would also allow determination of the expected time of parturition, an advantage in breeding programs with mouse strains that have difficulties at delivery. The exact time of fertile mating in mice is often unknown, so the ability to monitor and measure fetal organs would allow accurate estimation of gestational age, as in other species.

A routine method for assessing pregnancy and fetal development in humans and other animal species is real-time ultrasound imaging. However, the use of ultrasonography in mice has been described only very recently [10]. This study used a transducer with a frequency of 15 MHz, whereas commercial probes usually have a maximum of 10–11 MHz, frequencies first used in a study published during the developmental of our work [11]. Both studies examined a single strain (CD1), which is the most corpulent and which is not widely used in research.

The objectives of the current study were (a) to characterize, by ultrasonography, changes of phenotypic parameters in the developing mouse embryo throughout pregnancy, and (b) to determine the influence of genetic background on these parameters.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and husbandry

A total of 34 adult mice of breeding age were used (9 BALB/c, 10 C57BL/6 and 15 CD1). All animals were maintained at the CNIC Animal Unit in Madrid, Spain, which meets the requirements of European Union regulations regarding the use of animals for experimental and other scientific purposes. The study was carried out under Project License 156/07 from the CNIC scientific ethics committee. Animal manipulations were performed in accordance with the Spanish policy for animal protection (RD1201/05), which meets the requirements of European Union directive 86/609 regarding the protection of animals used for experimentation.

Females used in the study were placed with males at a 1:1 ratio. Pregnant females were identified by the presence of a vaginal plug after overnight mating, and gestational stage was estimated by defining the morning of that day as Day 0.5.

### 2.2. Ultrasonographic measurements of conceptus development

Observations were made by two sonographers, both of whom had no previous experience in the assessment of pregnancy in the mouse: one had prior experience with other species and the other was a complete novice. Serial scanings were done from Day 3.5 (estimated as the mean day of implantation; [12]) to Day 18.5. But to avoid excessive consecutive observations, which might damage the mouse or its conceptus, the mice were randomly divided into observation groups, and a different group was scanned each day. In this way individual mice were examined every 3 days. For ultrasound scanning, each mouse was held and maintained in dorsal recumbency by hand. Mice were not anesthetized, so as to avoid alterations to fetal parameters during observations, principally heart rate [13]. To minimize animal distress, abdominal hair was not shaved: coupling between transducer and skin was improved by thorough wetting of the abdomen with carboxymethylcellulose gel.

Two ultrasound scanners were used: an Aloka 2500 equipped with a multifrequency (7.5–10 MHz) sectorial array probe with a footprint of 40 mm; and a Siemens Antares connected to a multifrequency (7.5–10 MHz) linear array probe with a footprint of 35 mm. Ultrasound scanning was done by placing the transducer on one flank and moving it to the opposite flank, to view the uterine horns and fetus in transverse, frontal or sagittal planes. The probe was manipulated until the largest section of each structure was obtained. Scans were recorded, using the machines' "cine-loop" option; this allowed animals to be released quickly, minimizing stress caused by keeping them restrained. Complete examination of each female took approximately 3–4 min. The sizes (diameters and areas) of structures of interest were measured with built-in electronic calipers on the cine-loop recordings. To avoid distortions resulting from the corpulence of an individual fetus, measurements were taken from a minimum of three conceptuses in each scan recording.

### 2.3. Validation of the technique

Ultrasound determination of gestational stage in very early pregnancy was validated by anatomical inspection

Please cite this article in press as: Pallarés P, González-Bulnes A, Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes, *Theriogenology* (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012

of gestational structures in the uterus. Five selected animals, ultrasound scanned on Days 4.5, 8.5, 10.5, 12.5 or 14.5 of pregnancy, were afterwards anesthetized with isoflurane vapor and killed by cervical dislocation. Genital tracts were immediately removed for counting and characterization of gestational structures.

#### 2.4. Data analysis

Data obtained were grouped by day of gestation, and statistical analyses were carried out by using standard linear and quadratic tests. Predictive regression curves for each variable were calculated by the best adjustment of data in terms of their respective determination coefficients ( $R^2$ ). The effects of strain and litter size on correlations between day of gestation and embryo or fetal measures were tested by analysis of variance for repeated measures (split-plot ANOVA). Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M., and differences are considered statistically significant from  $P < 0.05$ .

#### 3. Results

The earliest structure that could be detected was the implantation site, at Day 4.5 after detection of the vaginal plug. Embryos themselves were detectable 1 day later, and the head and trunk could be differentiated from Day 6.5. The heart could be located by its beat at Day 9.5. Embryos were visualized in detail from Day 10.5: structures identified included head, umbilical cord

and placenta (Fig. 1). From Day 14.5, details of ossification in head, vertebrae, ribs and limbs were clearly recognizable, as were thoracic and abdominal organs (Fig. 2). Structures suitable for monitoring throughout pregnancy, and their relationship to gestational age, are detailed in Table 1.

The earliest measurements were the longitudinal diameter, transverse diameter, and total area of the embryonic vesicle, which were recorded from their first detection on Day 4.5 (Fig. 3). These parameters correlated significantly with gestational age ( $r^2 = 0.820$  for longitudinal section,  $r^2 = 0.746$  for transversal section and  $r^2 = 0.743$  for area;  $P < 0.0005$  for all) and increased exponentially during pregnancy (Fig. 4). There were no significant differences in longitudinal diameter among strains; however, both transverse diameter and total area were higher in CD1 mice from Day 13.5 of pregnancy ( $P < 0.05$ ).

Images of embryos were first obtainable at Day 5.5 of gestation, and from then until Day 18.5 we were able to take measurements of embryo or fetal crown-rump length, trunk diameter and trunk area (Fig. 5). These parameters increased exponentially during the development of conceptuses ( $r^2 = 0.828$  for crown-rump length,  $r^2 = 0.874$  for trunk diameter and  $r^2 = 0.784$  for trunk area;  $P < 0.0005$  for each). During the last week of pregnancy, BALB/c embryos were slightly shorter than other strains, and their trunk diameters and areas were significantly smaller ( $P < 0.05$ ). Regarding trunk girth, CD1 embryos were more corpulent than C57BL/6



Fig. 1. Ultrasound image (linear probe, frequency: 10 MHz, power: 100%, zoom: 1.5 $\times$ ) of a 10.5-day embryo (left) and macroscopic view of a dissected embryo at the same stage (right). In the ultrasound image, it is possible to identify the head (H), body (B), umbilical cord (UC) and placenta (P).

Please cite this article in press as: Pallares P, González-Bulnes A, Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes, Theriogenology (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012

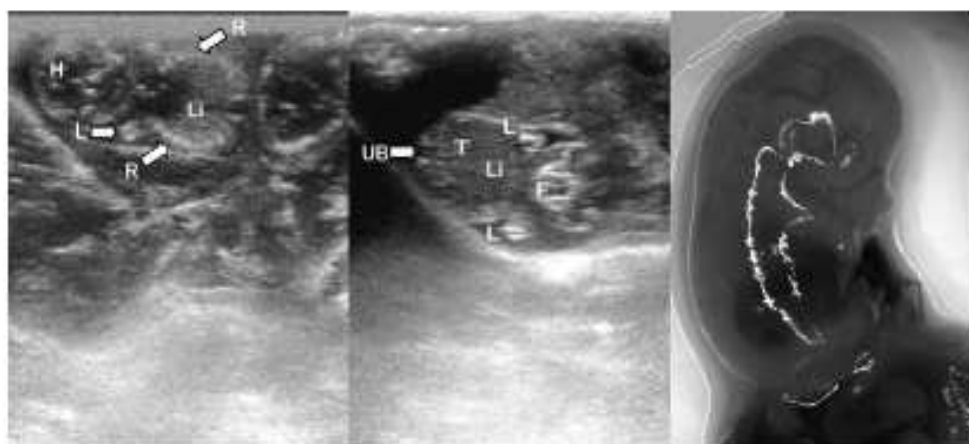


Fig. 2. Ultrasound images (linear probe, frequency: 10 MHz; power: 100%; zoom: 1.5×) of fetuses at 14.5 (left) and 16.5 days of gestation (center). A microscopic view of a 14.5-day embryo is shown on the right. In the ultrasound images, it is possible to differentiate the head (H) and the facial bones (F), the forelimbs (L) and, inside the trunk (T), the ribs (R), the liver (LI) and the abdominal mass, and the urinary bladder (UB).

embryos, and these in turn were more corpulent than BALB/c embryos (Fig. 6).

At more advanced stages, the position of fetuses within the uterus made it more difficult to get accurate measures of crown-rump length. We therefore used

head diameter as an alternative index of fetal size. The occipito-snout length and the biparietal diameter of the fetal head are easy to measure (Fig. 7), in both the longitudinal and transverse planes of a symmetric section of the skull. These parameters correlated closely

Table 1  
Relationship between embryo measurement by ultrasonography and gestational age (regression equations and  $R^2$  values) in BALB/c, C57BL/6 and CD1 mice

Measure	Curve	Mice strain	Equation	$R^2$
Embryonic vesicle (longitudinal diameter)	Exponential	BALB/c	$y = 1.7873e^{0.002x}$	0.902
		C57BL/6	$y = 1.2493e^{0.003x}$	0.856
		CD1	$y = 1.5585e^{0.004x}$	0.761
Embryonic vesicle (transverse diameter)	Exponential	BALB/c	$y = 1.2625e^{0.002x}$	0.872
		C57BL/6	$y = 0.8401e^{0.004x}$	0.843
		CD1	$y = 0.8507e^{0.004x}$	0.811
Embryonic vesicle (total area)	Exponential	BALB/c	$y = 0.0235e^{0.002x}$	0.827
		C57BL/6	$y = 0.0077e^{0.004x}$	0.849
		CD1	$y = 0.0133e^{0.004x}$	0.797
Crown-rump length	Exponential	BALB/c	$y = 0.5199e^{0.004x}$	0.882
		C57BL/6	$y = 0.7347e^{0.002x}$	0.857
		CD1	$y = 0.8401e^{0.004x}$	0.863
Trunk diameter	Exponential	BALB/c	$y = 0.9413e^{0.002x}$	0.785
		C57BL/6	$y = 0.9836e^{0.004x}$	0.552
		CD1	$y = 0.5875e^{0.004x}$	0.859
Occipito-snout length	Potential	BALB/c	$y = 0.0079x^{2.3664}$	0.602
		C57BL/6	$y = 0.0058x^{2.4059}$	0.831
		CD1	$y = 0.0169x^{2.0032}$	0.797
Biparietal diameter	Potential	BALB/c	$y = 0.0032x^{2.6841}$	0.758
		C57BL/6	$y = 0.0017x^{3.0012}$	0.830
		CD1	$y = 0.0071x^{2.4142}$	0.803

Please cite this article in press as: Pallarés P, González-Baltes A, Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes, *Theriogenology* (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012



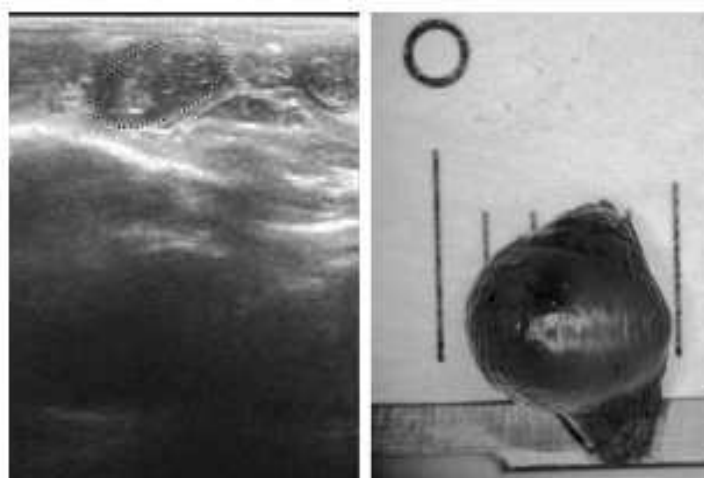


Fig. 3. Measurement of the embryonic vesicle at 8.5 days of pregnancy (left; dotted line) by ultrasonography (linear probe, frequency: 10 MHz; power: 100%; zoom: 2x), and a macroscopic view of a same stage conceptus (right).

with gestational age ( $r^2 = 0.763$  for occipito-snout length and  $r^2 = 0.765$  for biparietal diameter;  $P < 0.0005$  for all). Again, during the last week of pregnancy, measurements from BALB/c embryos were smaller than in the other two strains ( $P < 0.05$  for occipito-snout length; Fig. 8). But in contrast to the body measurements, head dimensions were larger in C57BL/6 than in CD1 mice ( $P < 0.005$ ).

Other anatomical structures that were amenable to measurement were orbit diameter and the lengths of the umbilical cord and femur; however, the reliability of these values was influenced by the position of the fetus. Of the embryonic annexes, the disc-shaped placentas (Fig. 9) was clearly distinguishable from Day 12.5, when it had a mean thickness of  $1.5 \pm 0.2$  mm, increasing to  $2.8 \pm 0.3$  mm by Day 18.5. Ultrasonographic assessment of heart and great blood vessel activities in individual embryos was easy to perform (Fig. 10); heart rate could be determined from the time of the first detection of the primordial heart, on Day 10.5, and remained stable throughout pregnancy. Genetic strain was found to have a significant influence on heart rate (Fig. 11): rate was similar in CD1 and C57BL/6 embryos ( $154.5 \pm 2.8$  and  $147.8 \pm 4.5$  beats/min, respectively) but was significantly lower in BALB/c embryos ( $127.0 \pm 2.1$  beats/min;  $P < 0.005$  vs. CD1 and C57BL/6).

#### 4. Discussion

The results of our study show the reliability of ultrasound scanning with 10 MHz linear probes for the

surveillance and measurement of mouse embryo development from very early stages of pregnancy (Day 4.5 post-coitum). Earlier reports by Russo et al. [11] and Brown et al. [10] started measurements from Day 7.5 to Day 9.5, respectively. Our study, therefore, is, to our knowledge, the first report on the serial visualization and measurement of embryonic/fetal structures in the mouse from the peri-implantational period. In the present study, differences in corpulence between strains and between individuals of the same strain were found from Days 10.5 to 11.5 post-coitum.

An important advantage of ultrasound is that the procedures are easy and fast. There is no need for anesthesia or abdominal clipping. This factor, aside from favoring animal well being, enables serial ultrasonographs to be obtained on successive days. Anesthesia, which was used in both the studies cited above, precludes serial repetition of scanning because of the possible consequences of repeated treatments for mother and fetuses [13]. Moreover, even a single session of anesthesia may alter fetal parameters such as heart rate. Finally, the short duration of the ultrasound examination avoids the risk of inducing changes in pre- and post-natal growth and development; however, some effects have been reported with exposures longer than 30 min and with frequencies up to 3.5 MHz [14].

The finding that ultrasonography can provide reliable measures of fetal organs and structures at very early developmental stages confirms its appropriateness as a tool for developmental studies in mice. Another advantage of measurements in early pregnancy is that

Please cite this article in press as: Pallares P, Gonzalez-Buñes A, Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes, Theriogenology (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012

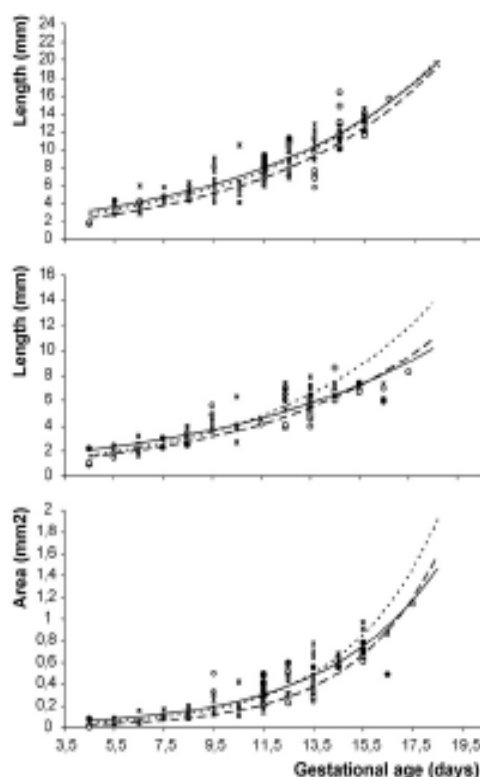


Fig. 4. Regression curves showing the relationship of the longitudinal and transverse diameters (upper and middle panels) and total area (lower panel) of the embryonic vesicle to gestational age in BALB/c (solid circles, continuous line), C57BL/6 (open circles, discontinuous line) and CD1 mice (asterisks, dotted line).

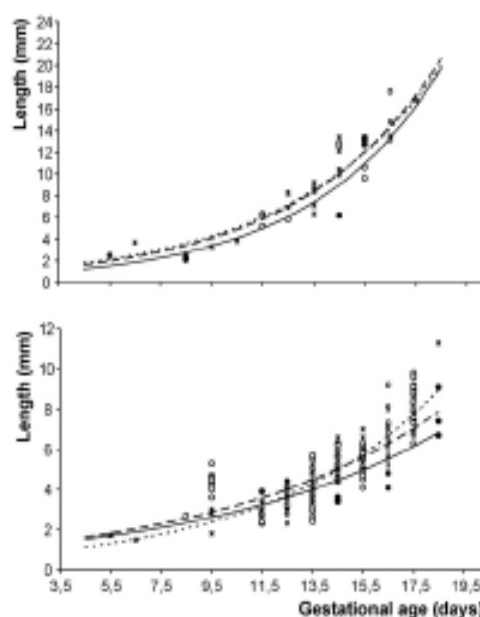


Fig. 6. Regression curves showing the relationship of embryo crown-rump length (upper panel) and trunk diameter (lower panel) to gestational age in BALB/c (solid circles, continuous line), C57BL/6 (open circles, discontinuous line) and CD1 mice (asterisks, dotted line).

they provide a more accurate estimation of gestational age. Studies in other species indicate that later in gestation the parameters measured are also affected by litter size and by the characteristics of individual

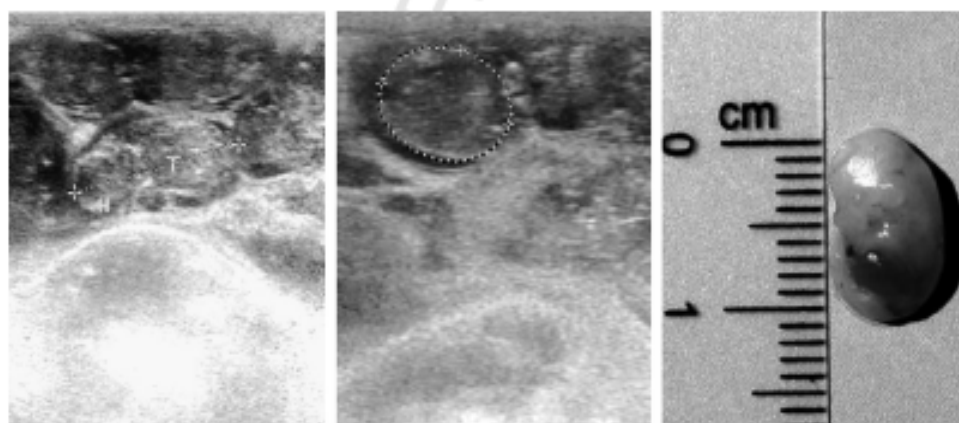


Fig. 5. Estimation of crown-rump length (left; dotted line, where H indicates the head and T the trunk of the embryo) and trunk diameter (center) in a 14.5-day embryo by ultrasonography (linear probe; frequency: 10 MHz; power: 100%; zoom: 1× and 2×). A macroscopic view of a dissected embryo at the same stage is shown on the right.



Fig. 7. Measurement of head biparietal diameter and occipito-snout length in a 17.5-day fetus (dotted lines). O, P and F indicate occipital, parietal and facial bones, respectively, while E is the eye and B is the brain (linear probe; frequency: 10 MHz; power: 100%; zoom: 2.5×).

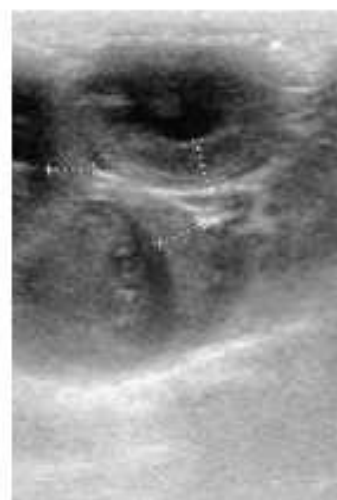


Fig. 9. Ultrasonography (linear probe; frequency: 10 MHz; power: 100%; zoom: 1.5×) of three gestational sacs at 14.5 days of pregnancy, in which it is possible to identify and measure the placentas of different embryos (dotted lines).

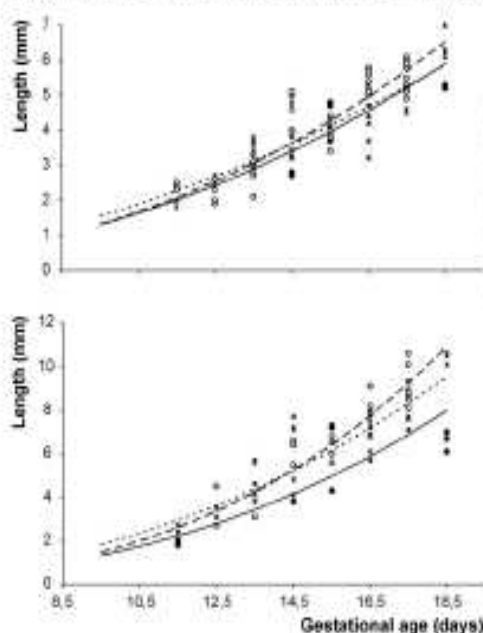


Fig. 8. Regression curves showing the relationship of embryo occipito-snout length (upper panel) and biparietal diameter (lower panel) to gestational age in BALB/c (solid circles, continuous line), C57BL/6 (open circles, discontinuous line) and CD1 mice (asterisks, dotted line).

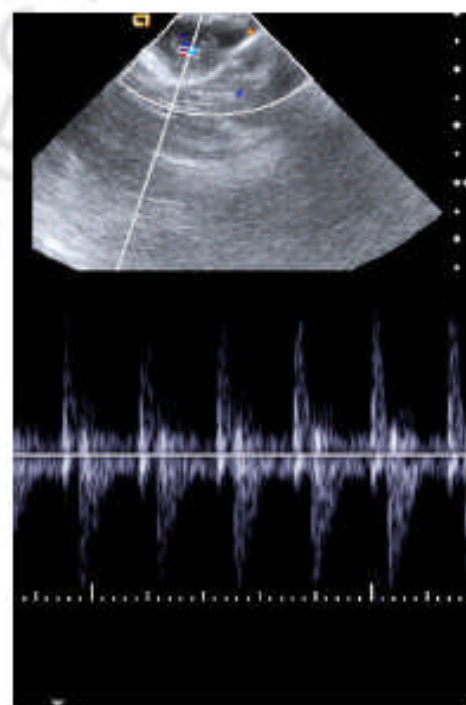


Fig. 10. Power and spectral Doppler images of the heart in a fetus at Day 14.5 of gestation.

Please cite this article in press as: Pallares P, González-Buñes A. Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes. *Theriogenology* (2008). doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012



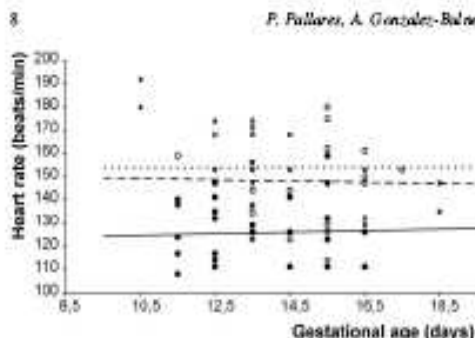


Fig. 11. Distributions and means (lines) of heart rate during pregnancy in BALB/c (solid circles, continuous line), C57BL/6 (open circles, discontinuous line) and CD1 mice (asterisks, dotted line).

fetuses, making them less reliable indicators of gestational age. These effects are determined mainly by genetic [15] or nutritional factors [16], and affect fetal weight but not fetal length or development [17,18]. Our findings show that this disturbance also occurs in mice, since differences in corpulence between strains and between individuals in the same strain were found from Days 10.5 to 11.5. The parameters that we found to be more readily obtainable and more correlated with gestational age were vesicle diameter, crown-rump length, trunk diameter, occipito-snout length and head biparietal diameter.

A study using higher resolution probes (15 MHz; [10]) has reported a high correlation between gestational sac size and gestational age, and between crown-rump length and biparietal diameter. Crown-rump length has classically been used for post-mortem examination of fetuses of many species, and is considered one of the most reliable parameters [19]. However, crown-rump length can be underestimated in *in vivo* studies because of the C-shape of developing embryos within the uterus. The other body measurements, the trunk diameters, are recognized in other species as being highly correlated with fetal age and weight [20]. However, fetal weight is itself a limiting condition, since it is determined by individual fetal corpulence, which we have found to vary within the same litter. Corpulence, as we report here, is also strongly affected by strain; CD1 fetuses are bigger than C57BL/6, and both these are bigger than BALB/c. This underlines the need to define growth curves for every breed.

The skull is usually easy to be recognized by ultrasonography. Occipito-snout length and biparietal diameter are easy to obtain by placing the electronic calipers on the hyperechogenic limit of the bones, bordering the soft tissues. Both these measures were higher in C57BL/6 mice, even though CD1 is the more corpulent strain. We wonder if this finding might be

related to the higher incidence of dystocia in C57BL/6 mice that we have found in our facilities, and which is confirmed by other animal units (X. Cañas, J. Martín and I. Blanco, personal communications). The comparison of different mouse strains in the current study has also allowed us to identify, for the first time, differences in embryonic heart rates between strains. The heart rates in CD1 and C57BL/6 embryos (154–155 beats/min) were similar to previously reported findings by Russo et al. [10], whereas BALB/c fetuses had a significantly lower heart rate (around 127 beats/min). This finding could form the basis for further studies aimed at developing applications of color and spectral Doppler and M-mode imaging for use in mice [21,22].

In conclusion, the use of ultrasonography allows the experimenter to establish the time of appearance of embryonic and fetal structures and to measure these structures throughout gestation in mice. Phenotypic characteristics, developmental changes and congenital malformations in living fetuses can thus be monitored by a simple non-invasive procedure. Embryonic vesicle, biparietal and trunk diameters, as well as the occipito-snout and crown-rump lengths, are relatively easy to estimate and provide a good indication of the development of the conceptus. The current study opens the way to establishing growth curves of these structures for each strain examined, which will be useful both for animal management and for research into mouse pregnancy. These measurements are expected to be more accurate in early pregnancy since, as we have shown here, differences in corpulence between strains and between individuals in the same strain are found from Days 10.5 to 11.5 post-coitum.

#### Acknowledgements

The authors gratefully thank Santiago Rodríguez and the staff of the CNIC Animal Unit for skilled technical assistance. The authors are also very grateful to Ana Vidaurrazaga (Aloka España, Madrid, Spain) and Isaac Cisneros (RX Cisneros Electromedicina, Madrid, Spain) for the provision of ultrasound machines and probes, and to Dr. Xavier Cañas (Animal Research Center, Parc Científic de Barcelona, Spain), Dr. Juan Martín (Laboratory Animal Units, Barcelona Biomedical Research Park, Spain) and Isabel Blanco (Laboratory Animal Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain) for helpful discussions on the reproductive characteristics of the different strains used. The editorial assistance provided by Dr. Simon Bartlett is gratefully acknowledged.

Please cite this article in press as: Pallarés P, González-Buñes A. Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes. *Theriogenology* (2008). doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012

## References

- [1] Foster HL. The mouse in biomedical research vol 3 (embryology). London (UK): Academic Press Ltd.; 1983. p. 134–135.
- [2] Marshall E. The rise of the mouse: biomedicine's model mammal. *Science* 2000;288:248–57.
- [3] Smith BR, Johnson GA, Gorman EV, Linney E. Magnetic resonance microscopy of mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3530–3.
- [4] Chapon C, Franco F, Roux J, Maesiaux L, Le Jeune JJ, Lemaire L. In utero time-course assessment of mouse embryo development using high-resolution magnetic resonance imaging. *Anat Embryol* 2002;206:131–7.
- [5] Alvres ET, Srinivas M, Capuano S, Simhan HN, Schatten GP. Magnetic resonance imaging of embryonic and fetal development in model systems. *Methods Mol Med* 2006;124:87–101.
- [6] Foster PS, Pollin CJ, Harsiewicz KA, Christopher DA, Turnbull DH. Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound Med Biol* 2000;26:1–27.
- [7] Foster PS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mei J, Chen E, Harsiewicz KA, Stokowski BG, Zou L, Knapik DA, Adamson SL. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:1165–72.
- [8] Foster PS, Zhang M, Duckett AS, Cicevic V, Pollin CJ. In vivo imaging of embryonic development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2361–6.
- [9] Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim* 1995;23:298–304.
- [10] Brown SD, Zarukowski D, Rodriguez DP, Dunning PS, Harley RJ, Taylor GA. Ultrasound diagnosis of mouse pregnancy and gestational staging. *Comp Med* 2006;36:262–71.
- [11] Russo M, Moomatino L, Greco A, Canone G, Coccia N, Totton G, Brunetti A. Pregnancy detection in mice using ultrasound. *Vet Rec* 2007;160:446–7.
- [12] Kaufman MH. Atlas of mouse development. London: Academic Press Ltd.; 1989. 512.
- [13] Mazze RI, Wilson AL, Rice SA, Baden JM. Fetal development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* 1985;32:339–45.
- [14] Rao S, Ouchinskoy N, McRae A. Gestational stage sensitivity to ultrasound effect on postnatal growth and development of mice. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol* 2006;76:602–8.
- [15] Stephenson SK, Lambourn LJ. Prenatal growth in Romney x Southdown cross and Australian Merino sheep. *Aust J Agric Res* 1960;2:1044–63.
- [16] Richardson C. Morphological parameters of intrauterine growth retardation in the newborn lamb. *Vet Rec* 1976;101:151–2.
- [17] Wenham G. A radiographic study of early skeletal development in foetal sheep. *J Agric Sci Camb* 1981;96:39–44.
- [18] Wenham G. A radiographic study of the changes in skeletal growth and development of the foetus caused by poor nutrition in the pregnant ewe. *Br Vet J* 1981;137:176–87.
- [19] Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Anat Histol Embryol* 1973;2:11–45.
- [20] Kleeman DO, Smith DH, Walker SK, Seamark RF. A study of real-time ultrasonography for predicting ovine foetal growth under field conditions. *Aust Vet J* 1987;64:332–3.
- [21] Spurney CF, Lo CW, Leatherbury L. Fetal mouse imaging using echocardiography: a review of current technology. *Echocardiography* 2006;23:891–9.
- [22] Stypanum J. Doppler ultrasound in mice. *Echocardiography* 2007;24:97–112.

Please cite this article in press as: Pallares P, Gonzalez-Bulnes A. Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes. *Theriogenology* (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.02.012





## Artículos Científicos

*Disruption of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene affect Ovulation, Fertilization and Early Embryo Survival in a Knockout Mouse Model* (Pilar Pallares, Rosa A. Garcia-Fernandez, Luis M. Criado, Claudia A. Letelier, David Esteban, Jose M. Fernandez-Toro, Juana M. Flores y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en International Journal of Developmental Biology; incluye datos relacionados con el Experimento 3.



## Disruption of the Endothelial Nitric Oxide Synthase gene affect ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model

Pilar Pallares<sup>1</sup>, Rosa A. Garcia-Fernandez<sup>2</sup>, Luis M. Criado<sup>1</sup>, Claudia A. Letelier<sup>3,4</sup>, David Esteban<sup>1</sup>, Jose M. Fernandez-Toro<sup>1</sup>, Juana M. Flores<sup>2</sup> and Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Melchor Fernandez Almagro 3. 28029-Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Dpto. de Medicina y Cirugia Animal, Facultad de Veterinaria, UCM. 28040-Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Dpto. de Reproduccion Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Instituto de Ciencia Animal y Tecnologia de Carnes, UACH. Casilla 567, Valdivia, Chile.

---

### Abstract

Two consecutive experiments determined whether disruption of the endothelial NOS (NOS3) gene affect ovulation, fertilization, implantation and embryo development. In the first trial, *Nos3*-knockout mice (groups *Nos3*<sup>-/-</sup>) and wild-type mice (groups *Nos3*<sup>+/+</sup>) showed significant differences in mean number of corpora lutea ( $9.7 \pm 1.2$  in *Nos3*<sup>-/-</sup> vs  $14.2 \pm 1.2$  in *Nos3*<sup>+/+</sup>;  $P < 0.01$ ), rate of anovulation ( $48.3 \pm 7.3$  % in *Nos3*<sup>-/-</sup> vs  $29.7 \pm 6.3$  in *Nos3*<sup>+/+</sup>;  $P < 0.05$ ), total recovered oocytes/zygotes ( $4.0 \pm 1.1$  in *Nos3*<sup>-/-</sup> vs  $10.4 \pm 1.6$  in *Nos3*<sup>+/+</sup>;  $P < 0.01$ ) and non-fertilization rates ( $50.7$  in *Nos3*<sup>-/-</sup> vs  $3.3\%$  in *Nos3*<sup>+/+</sup>;  $P < 0.001$ ). In the second trial, implantation and early pregnancy losses in *Nos3*-knockout and wild-type dams were detected by real-time ultrasound imaging. The number of embryos reaching implantation was higher in *Nos3*<sup>+/+</sup> than in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice ( $7.5 \pm 0.4$  vs  $4.0 \pm 0.4$ ;  $P < 0.005$ ); thereafter, embryo losses were detected between Days 8.5 and 13.5, in 62.5% of the *Nos3*-knockout dams and, at Days 10.5 and 11.5, in 16.7% of the control females ( $P < 0.005$ ). Thus, NO and NOS3 deficiencies affect reproductive and developmental features in the *Nos3*-knockout mouse model.

**Keywords:** Litter-size, Embryo, Ovulation, Knockout-mice, Nitric-Oxide

---

Corresponding author: Pilar Pallares. Phone: 00 34 91 453 12 02. FAX: 0034 91 453 12 65.  
E-mail: ppallares@cnic.es (P. Pallares)

### Introduction

The nitric oxide (NO), an essential mediator in numerous physiological processes (Lowenstein et al. 1994), is synthesized by three different NO synthases (NOS): neuronal constitutive (type I, nNOS or NOS1), inducible NOS (type II, iNOS or NOS2) and endothelial constitutive (type III, eNOS or NOS3). The isoform NOS3 is involved in female reproductive function (Maul et al. 2003; Thaler and Epel 2003); the lack of NOS3 in *Nos3*-knockout mice (Mashimo and Goyal 1999; Gregg 2003) has been found to cause a reduction in the number of offspring and in the weight of the neonates at delivery (Hefler et al. 2001; Longo et al. 2004; Van der Heijden et al. 2005). These effects were early related to lower fetal growth and higher mortality at the end of gestation (Hefler et al. 2001; Van der Heijden et al. 2005). In these later stages of pregnancy, embryo survival and growth is mainly affected by the uterine capacity of the dam (Bennett and Leymaster 1989) and, hence, litter size and weight are highly correlated with maternal body size and weight (Van Engelen et al.

1995). Thus, offspring features are enhanced in multiparous *Nos3*-knockout mothers when compared to primiparous or oligoparous females (Longo et al. 2004).

However, early studies have reported that in mice, like in other species, litter size is also determined both by the number of ovulations (Joakimsen and Baker 1977) and the incidence of embryo losses during early pregnancy (Bakker et al. 1978; Durrant et al. 1980). Several studies have emphasized the role of NO and NOS, and specifically NOS3, in processes of ovulation, fertilization, implantation and early embryo development (Gouge et al. 1998; Purcell et al. 1999; Gaglioti et al. 2000; Maul et al. 2003; Thaler and Epel 2003).

Thus, the current study aimed to determine whether deficiencies in NOS3 gene affect reproductive features of the *Nos3*-knockout mouse at very early stages of pregnancy. Two consecutive experiments were performed. The first trial compared the ovulation and fertilization rates of adult female *Nos3*-knockout and wild-type mice. The second trial compared the incidence of early pregnancy losses in pregnant *Nos3*-knockout and wild-type dams, determining the number of conceptuses in the same animals in successive days throughout gestation. For this dynamic study of the conceptuses, *in vivo* monitoring was done by using real-time ultrasound imaging; a well-recognized, non-invasive and reliable method for assessment of pregnancy and fetal development in most of the species, including the mouse (Brown et al. 2006; Russo et al. 2007) from very early pregnancy stages (Day 4.5 p.c.; Pallares and Gonzalez-Bulnes, unpublished study).

## Material and methods

### *Animals and husbandry*

The study was performed by comparing reproductive features in mice that were homozygous for the disruption of the endothelial NOS gene (groups *Nos3*<sup>-/-</sup>; strain: B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1Unc</sup>/J, N9 generation backcrossing with C57BL/6J mice) and wild-type C57BL/6J mice (groups *Nos3*<sup>+/+</sup>). All the animals were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and maintained at the facilities of the CNIC Animal Laboratory Unit in Madrid, Spain. The lighting cycle was 14h:10h light:dark, respectively (07:30 on; 21:30 off). Humidity was maintained around 50% and the temperature was around 21°C. CNIC Animal Unit meets the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. The experiments were carried out under Project Licenses 156/07 and 176/07 from the CNIC Scientific Ethic Committee. Animal manipulations were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 about the protection of animals used in experimentation.

### *Experimental design*

In the first trial, ovulation and fertility rates were evaluated in 8 adult female *Nos3*-knockout mice and 8 wild-type control dams ovulating in response to a treatment for synchronization of estrus and ovulation. In brief, animals were treated by injecting, on Day -3, one intraperitoneal dose of 0.5µg of a prostaglandin analogue (cloprostenol, Estrumate, Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, G) and one subcutaneous dose of 3µg of progesterone (4-pregnen-3,20-dione, Siemsgluss Iberica, Barcelona, Spain) in saline; on Day 0, dams were treated with a second intraperitoneal injection of 0.5µg of cloprostenol. Immediately thereafter, females were mated in homozygosis with B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1Unc</sup>/J and C57BL/6J fertile males in a rate of 1:1. Appearance of estrus and coital behaviors were determined the following morning (Day 0.5 of pregnancy), by evaluating presence of a vaginal plug as result of overnight mating. For determining ovulation and fertility rates, females were sacrificed by

cervical dislocation; embryos/oocytes were immediately retrieved and ovaries were removed and processed thereafter.

In the second trial, the incidence of early pregnancy losses was compared in 8 pregnant *Nos3*-knockout and 12 pregnant wild-type dams, treated with the protocol described above. Females were also mated in homozygosis in a rate of 1:1 and appearance of estrus was verified on the following morning (Day 0.5 of pregnancy), by evaluating vaginal plugs. Determination of pregnancy, number of conceptuses and embryo losses was performed, by ultrasonography, from Day 6.5 to 18.5 of gestation.

#### *Assessment of the number of oocytes/zygotes*

The relative number of oocytes and zygotes was evaluated just after recovery from oviduct under a stereoscopic microscope (Leica MZ12.5, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). In brief, recoveries were performed by thoroughly dissecting both oviducts free from adjacent tissues with fine scissors and placing them in a Petri dish (Nunclo<sup>TM</sup>, Nunc International, Roskilde, Denmark) containing a drop of KSOM-AA medium (MR-121-D; Specialty Media<sup>TM</sup>, Millipore Co., Billerica, MA, USA) with 1M Hepes (15630-049; Gibco<sup>TM</sup>, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) and 300 µg/ml hyaluronidase type IV-S (H3884; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Immediately, both ampullae were slit lengthways with a pair of fine forceps and the recovered oocytes/embryos were counted and classified, under a light microscope (Zeiss Axio Observer D1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), as fertilized or non-fertilized on the basis of the presence of pronuclei.

#### *Processing of ovaries and cytomorphometry*

The ovaries were placed and washed, just after removal, in phosphate-buffered saline (PBS); immediately, the ovaries were fixed in Bouin's solution, and, thereafter, embedded in paraffin and sectioned (5 µm). Around 15-19 slides were selected (at least 8–10 sections apart) from serial sections of each ovary from each mouse. These slides were stained with hematoxylin and eosin, and the number of corpora lutea and anovulatory follicles were counted in ovarian sections using light microscopy (Olympus DX50, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA).

#### *Indexes of ovulation and fertilization*

The following information was recorded for each dam: number of corpora lutea, number of anovulatory follicles, total number of recovered oocytes and zygotes, number of unfertilized oocytes and number of fertilized zygotes. The rate of anovulation was obtained by dividing, in every mouse, the total number of anovulatory follicles by the total number of anovulatory follicles and corpora lutea. The rate of recovery was obtained by dividing, in every mouse, the total number of recovered oocytes and zygotes by the total number of corpora lutea. The rate of unfertilized oocytes was obtained by dividing the number of unfertilized oocytes by the total number of recovered oocytes and embryos. The rate of viability resulted from dividing the number of viable zygotes by the number of recovered oocytes and zygotes. For clarity, all rates are expressed as percentages within this article.

#### *Ultrasonographic evaluation of conceptuses*

Ultrasound scanning was performed using 2 different machines; an Aloka 2500 equipped with a multifrequency (7.5-10 MHz) sectorial array probe and a Siemens Antares connected to a multifrequency (7.5-10 MHz) linear array probe. For examination, the mice were manually restrained in dorsal recumbence. Anesthesia was avoided for preventing any effect on pregnancy (Mazze et al. 1985). In order to diminish animal distress, abdominal hair was

not clipped; the presence of air between the skin and the transducer, which makes the quality of the images worse, was avoided by abundantly wetting the abdomen with carboxymethylcellulose gel. Scanning was done by placing the transducer on the abdominal wall and moving it in different directions for viewing the uterine horns and their content; when presence of gestational structures were determined, the number of embryos/fetuses was determined by placing the transducer in one side of the abdomen and moving it to the opposite.

#### *Indexes of prolificacy and embryo losses*

The following information was recorded in every scan for each dam: number of embryos, number of living embryos and number of dead embryos by lack of heart beats and/or appearance of reabsorption processes. Every day, the presence and number of embryo losses was obtained by determining dead embryos and/or disappearance of embryos when compared with the previous day. The rate of embryo losses was obtained, for the entire pregnancy and every day, by dividing the number of embryo losses by the total number of embryos at first scanning. For clarity, all rates are expressed as percentages within this article.

#### *Data analysis*

The effects of genotype on indexes of ovulation, fertilization and prolificacy were tested by analysis of variance (ANOVA). The effects of genotype on the presence and number of embryo losses throughout the pregnancy were determined by analysis of variance for repeated measures (split-plot ANOVA). All results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and statistical significance was accepted for  $P < 0.05$ .

## **Results**

#### *Effects of NOS3 deficiencies on ovulation and fertilization rates*

The size of the ovaries and the structures inside were very different between both genotypes (Figure 1). There were significant differences in mean ovulation rate and ovulatory efficiency between groups (Table I), as reflected by the number of corpora lutea (CL:  $9.7 \pm 1.2$  in  $Nos3^{-/-}$  vs  $14.2 \pm 1.2$  in  $Nos3^{+/+}$ ;  $P < 0.01$ ), rate of anovulation (AR:  $48.3 \pm 7.3$  % in  $Nos3^{-/-}$  vs  $29.7 \pm 6.3$  in  $Nos3^{+/+}$ ;  $P < 0.05$ ) and total recovered oocytes/zygotes (RE:  $4.0 \pm 1.1$  in  $Nos3^{-/-}$  vs  $10.4 \pm 1.6$  in  $Nos3^{+/+}$ ;  $P < 0.01$ ).

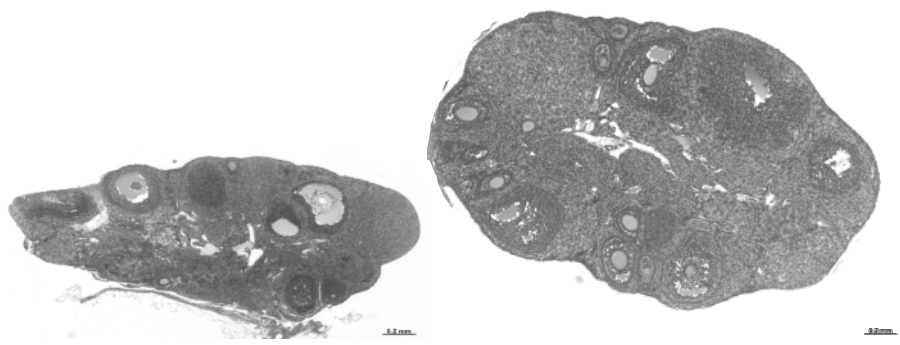


Figure 1. Histological images of the ovaries on Day 0.5 of induced estrous cycle in *Nos3*-knockout mice ( $Nos3^{-/-}$ , left hand) and wild-type controls ( $Nos3^{+/+}$ , right hand).

Thereafter, a mean of  $2.0 \pm 1.0$  of these RE were found to be fertilized in the *Nos3*<sup>-/-</sup> group; which indicates a non-fertilization rate of 50.7%, significantly higher than in the control group (3.3%,  $P < 0.001$ ).

Table 1. Differences in rates of ovulation and fertilization in *Nos3*-knockout mice (*Nos3*<sup>-/-</sup>) and wild-type controls (*Nos3*<sup>+/+</sup>).

	Genotype	
	<i>Nos3</i> <sup>-/-</sup>	<i>Nos3</i> <sup>+/+</sup>
Ovulation rate	$9.7 \pm 1.2^c$	$14.2 \pm 1.2^d$
Anovulatory follicles	$10.0 \pm 2.0$	$7.0 \pm 1.9$
Rate of anovulation (%)	$48.3 \pm 7.3^a$	$29.7 \pm 6.3^b$
Number of recovered oocytes/zygotes	$4.0 \pm 1.1^c$	$10.4 \pm 1.6^d$
Recovery rate (%)	$52.6 \pm 19.2^a$	$76.4 \pm 11.9^b$
Number of fertilized zygotes	$2.0 \pm 1.0^e$	$10.0 \pm 1.6^f$
Fertilization rate (%)	$49.3 \pm 20.0^g$	$97.0 \pm 3.3^h$
Number of unfertilized oocytes	$2.0 \pm 1.2^a$	$0.4 \pm 0.1^b$
Non-fertilization rate (%)	$50.7 \pm 20.0^g$	$3.3 \pm 3.3^h$

Mean  $\pm$  S.E.M. within rows with different superscripts differ (<sup>a-b</sup>  $P < 0.05$ , <sup>c-d</sup>  $P < 0.01$ , <sup>e-f</sup>  $P < 0.005$ , <sup>g-h</sup>  $P < 0.001$ ).

#### *Effects of NOS3 deficiencies on number of embryos/fetus throughout pregnancy*

At first visualization of the embryos inside the gestational sacs, between Days 6.5 and 8.5 after vaginal plug (Figure 2), the number of embryos reaching implantation was higher in *Nos3*<sup>+/+</sup> than in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice ( $7.5 \pm 0.4$  vs  $4.0 \pm 0.4$ ;  $P < 0.005$ ); ranging from 2 to 5 in *Nos3*<sup>-/-</sup> and between 6 and 10 in *Nos3*<sup>+/+</sup>.



Figure 2. Ultrasonographic imaging of mouse gestational structures at Days 6.5 (left picture), 9.5 (central picture) and 12.5 of pregnancy (right picture).

Thereafter, the serial study showed evidences of embryo losses in 62.5% of the *Nos3*-knockout dams and 16.7% of the control females ( $P < 0.005$ ). The percentage of embryo losses ranged from 25 to 100% of the conceptuses (mean rate of  $49.9 \pm 0.1\%$ ), whilst remained below 20% in wild-type dams ( $P < 0.005$ ). Embryo losses were detected at Days 10.5 and 11.5 p.c. in controls and between Days 8.5 and 13.5 in *Nos3*-knockout mice. In this last group, two periods of greatest percentages of losses were identified; between Days 8.5 and 10.5 (55.6%) and at Day 13.5 (44.4% of the total losses).



## Discussion

Previous studies on causes of the reduction in the number of offspring in *Nos3*-knockout mice have reported lower growth and higher mortality of the fetuses at the end of gestation (Bennett and Leymaster 1989; Hefler and Gregg 2002). Conversely, the *in vivo* screenings performed in current study during early pregnancy stages evidence that prolificacy in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice is hampered by variations in rates of ovulation, fertilization and early embryo survival when compared with their wild-type counterparts. Possible causes for discrepancies with previous works may be related to the strains and the number of animals used or to the fact that these previous studies were performed postmortem and only in late gestation, lacking data on early pregnancy. Thus, our results are confirming, *in vivo*, other previous data on the role of NO and NOS3 in processes of ovulation, fertilization, implantation and early embryo development

The influence of NO, and NOS, in processes of ovulation was early documented in rats; ovulation was suppressed by the administration of NOS inhibitors and restored by the concomitant administration of a NO generator (Shukovski and Tsafiriri 1994). *In vitro* studies (Zackrisson et al. 1996) found that NOS2 was localized in granulosa cells of the follicle whilst high levels of NOS3 were found in blood vessel endothelium, theca cells of the follicle and luteal cells of the corpus luteum; NOS1 has not been found in ovarian tissues. Thereafter, the knowledge of the role of NO and NOS in biological processes was broadened by the use of knockout mice. Evaluation of reproductive features in *Nos3*-knockout superovulated immature dams showed a lower ovulatory efficiency when compared to the controls (Jablonka-Shariff and Olson 1998). Later studies with *Nos2*- and *Nos3*-knockout mice showed that disruption of NOS2 had no effect on ovulation rate in superovulated prepuberal females; on the other hand, NOS3 deficiency had a significant negative effect (Hefler and Gregg 2002). Our results, assessing non-stimulated cycles in mature females (a more physiological approach, since we cannot discard interactions between NO, NOS and exogenous gonadotrophins as indicated by Thaler and Epel, 2003) are in agreement with these results and supporting the hypothesis of Gregg (2003) about the role of eNOS as an important modulator of ovulation efficiency in mouse.

The effects of NOS3 deficiencies in ovulation may be mediated by changes in follicle development (Jablonka-Shariff et al. 1999; Tempfer et al. 2000), in the preovulatory LH surge (McCann et al. 2003) and/or the ovulatory process by itself (Thaler and Epel 2003). Thaler and Epel (2003), revising many previous studies, suggest a model in which the preovulatory LH surge induces follicle cells to activate NOS; NOS induces production of NO, which stimulates synthesis of prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> and, thus, ovulation.

NOS3 is not only found in follicle and luteal cells, but also in the oocyte (Jablonka-Shariff and Olson 1997); these researchers elegantly demonstrated the existence of abnormalities in the oocyte meiotic maturation in NOS3-deficient mice (Jablonka-Shariff and Olson 1998). Absence or delays in meiotic maturation may be the origin of the fertilization failures found in our study; other possible causes indicated by other authors may be related to the key role of NO in egg activation via regulation of the calcium rise (Kuo et al. 2000). Calcium rise is induced by the NO provided both by the endogenous activation of NOS in the egg and by the fertilizing sperm (Thaler and Epel 2003); sperm that, in our study, came from *Nos3*-knockout males. However, we cannot leave aside, as possible causes for deficiencies in fertilization, the existence of alterations and/or mistiming in the periovulatory processes cited above (preovulatory LH surge, prostaglandin secretion and/or ovulatory rupture).

Implantation and early embryo development were also found, in the second trial of current study, to be affected by NOS3 deficiencies; confirming previous studies on the role of NOS3 in implantation (Maul et al. 2003). In fact, the three NOS isoforms are present within the mouse implantation site, with NOS2 and NOS3 being the most important (Purcell et al.

1999). NO has been also found to be produced by preimplantation embryos, this production being required for normal embryo development (Gouge et al. 1998). These authors and Gaglioti et al. (2000) found that NOS3 is present in the trophoblast, the cells that adhere to and penetrate the uterine endometrium at implantation. These findings may be related to the fact that embryos nutrition before completion of the placenta is achieved by phagocytic activity of the trophoblast (Schilesinger and Koren 1975; Pavia 1983); activity mediated by reactive oxygen species (Gaglioti et al. 1996). During implantation, dilatation of uteroplacental arteries is induced by NOS3 from the extravillous trophoblast (Nanaev et al. 1995). In summary, NOS3 induces vasodilatation, angiogenesis and phagocytosis of maternal cells occurring during the implantation process (Gaglioti et al. 2000).

Embryo survival after implantation was also found to be affected in current study; confirming, *in vivo*, previous reports from *in vitro* studies indicating that embryos with inhibition for the NOS enzyme become developmentally delayed or nonviable (Gouge et al. 1998). We have to note that the daily screening of conceptus development indicated two critical points for embryo survival throughout pregnancy of *Nos3*<sup>-/-</sup> mice. The first, between Days 8.5 and 10.5 of pregnancy; which is coincidental with the losses found in the wild-type controls. The second, at Day 13.5 of gestation. Both periods are coincidental with the results found in a previous study developed in our laboratories for the assessment of effects of NOS3 deficiencies on embryo and fetal development, in which retardations in the development of the embryo and gestational sac were found at these stages (Pallares and Gonzalez-Bulnes 2008). And both periods are critical in mouse embryogenesis. In the mouse, at Day 8.5 of pregnancy, commences the gastrulation (Boucher and Pedersen 1996). Gastrulation is the process originating the three primary germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm) of the embryo and the extra-embryonic mesoderm, which differentiates into the allantois and the mesodermal components of the chorion, amnion and visceral yolk sac. In this period, starts the development of the embryo heart and the yolk sac blood circulation (Chen and Hsu 1982); blood islands within yolk sac will originate endothelial and hematopoietic cells (Flamme et al. 1997). Later, around 12.5-14.5 of pregnancy occurs the period of transition between the stages of late embryo and early fetus (Evans and Sack 1973). In the postimplantation period and early placental development, NO and NOS3 are hypothesized to be involved in tissue remodeling, immunosuppression and vasoregulation (Purcell et al. 1999); contributing to maintain vasodilatation and preventing the coagulation necessary for the success of the early pregnancy (Gaglioti et al. 2000).

In conclusion, current results indicate, by using the *Nos3*-knockout mouse model, that NO and NOS3 deficiencies affect the processes of ovulation, fertilization, implantation and embryo viability during early pregnancy stages.

### Acknowledgements

The authors appreciatively thank Dr. J.M. Redondo for cession of mice used in this experiment and the staff of CNIC Animal Unit and P. Aranda, A. Castro and V. Vera from UCM for skilled technical assistance. The help, providing different ultrasound machines and probes, from A. Vidaurrezaga (Aloka España, Madrid, Spain) and I. Cisneros (RX Cisneros Electromedicina, Madrid, Spain) is also acknowledged. Current study was developed under a collaborative project (CC07-018) between CNIC and INIA. CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation, INIA is supported by the Spanish Ministry of Education and Science Affairs; there were no other outside funding.

### References

- Bakker, H.J., Wallinga, J.H., and Politiek, R.D. 1978. Reproduction and bodyweight of mice after long-term selection for large litter-size. *J. Anim. Sci.* **46**: 1572–1580.

- Bennett, G.L., and Leymaster, K.A. 1989. Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine. *J. Anim. Sci.* **67**: 1230–1241.
- Boucher, D.M., and Pedersen, R.A. 1996. Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**: 765–777.
- Brown, S.D., Zurakowski, D., Rodriguez, D.P., Dunning, P.S., Hurley, R.J., and Taylor, G.A. 2006. Ultrasound diagnosis of mouse pregnancy and gestational staging. *Comp. Med.* **56**: 262–271.
- Chen, L.T., and Hsu, Y.C. 1982. Development of mouse embryos in vitro: preimplantation to the limb bud stage. *Science* **218**: 66–68.
- Durrant, B.S., Eisen, E.J., and Ulberg, L.C. 1980. Ovulation rate, embryo survival and ovarian sensitivity to gonadotrophins in mice selected for litter size and body weight. *J. Reprod. Fertil.* **59**: 329–339.
- Evans, H.E., and Sack, W.O. 1973. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anat. Histol. Embryol.* **2**: 11–45.
- Flamme, I., Frolich, T., and Risau, W. 1997. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **173**: 206–210.
- Gaglioti, S., Colepicilo, P., and Bevilacqua, E. 1996. Reactive oxygen species and phagocytosis process of hemochorial trophoblast. *J. Braz. Assoc. Adv.* **48**: 37–42.
- Gaglioti, S., Scavone, C., and Bevilacqua, E. 2000. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol. Reprod.* **62**: 260–268.
- Gouge, R.C., Marshburn, P., Gordon, B.E., Nunley, W., and Huet-Hudson, Y.M. 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol. Reprod.* **58**: 875–879.
- Gregg, R.A. 2003. Mouse models and the role of nitric oxide in reproduction. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 391–398.
- Hefler, L.A., and Gregg, A.R. 2002. Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. *Fertil. Steril.* **77**: 147–151.
- Hefler, L.A., Reyes, C.A., O'Brien, W.E., and Gregg, A.R. 2001. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol. Reprod.* **64**: 666–673.
- Jablonka-Shariff, A., and Olson, L.M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinol.* **138**: 460–468.
- Jablonka-Shariff, A., and Olson, L.M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinol.* **139**: 2944–2954.
- Jablonka-Shariff, A., Ravi, S., Beltsos, A.N., Murphy, L.L., and Olson, L.M. 1999. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol. Reprod.* **61**: 171–177.
- Joakimsen, Ø., and Baker, R.L. 1977. Selection for litter size in mice. *Acta Agric. Scandin.* **7**: 301–318.
- Kuo, R.C., Baxter, G.T., Thompson, S.H., Stricker, S.A., Patton, C., Bonaventura, J., and Epel, D. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* **406**: 633–636.
- Longo, M., Jain, V., Langenveld, J., Vedernikov, Y.P., Garfield, R.E., Hankins, G.D., Anderson, G.D., and Saade, G.R. 2004. Enhanced growth and improved vascular function in offspring from successive pregnancies in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**: 1470e6.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., and Snyder, S.H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* **120**: 227–237.
- Mashimo, H., and Goyal, R.K. 1999. Lessons from genetically engineered animal models IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **277**: 745–750.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G.R., and Garfield, R.E. 2003. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 359–380.
- Mazze, R.I., Wilson, A.I., Rice, S.A., and Baden, J.M. 1985. Fetal development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* **32**: 339–345.
- McCann, S.M., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W.H. 2003. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 381–390.
- Nanaev, A., Chwalisz, K., Frank, H.G., Kohnen, G., Hegele-Hartung, C., and Kaufmann, P. 1995. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res.* **282**: 407–421.
- Pallares, P., and Gonzalez-Bulnes, A. 2008. Intrauterine growth retardation in endothelial nitric oxide synthase deficient mice is established from early pregnancy stages. *Biol. Reprod.* (in press).

- Pavia, C.S. 1983. Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. *J. Infect. Dis.* **147**: 1006–1010.
- Purcell, T.L., Given, R., Chwalisz, K., and Garfield, R.E. 1999. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol. Human Reprod.* **5**: 467–475.
- Russo, M., Meomartino, L., Greco, A., Catone, G., Cocchia, N., Tortora, G., and Brunetti, A. 2007. Pregnancy detection in mice using ultrasound. *Vet. Record* **160**: 446–447.
- Schilesinger, M., and Koren, Z. 1975. Mouse trophoblast cells in tissue culture. *Fertil. Steril.* **18**: 95–101.
- Shukovski, L., and Tsafiriri, A. 1994. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinol.* **135**: 2287–2290.
- Tempfer, C., Moreno, R.M., O'Brien, W.E., and Gregg, A.R. 2000. Genetic contributions of the endothelial nitric oxide synthase gene to ovulation and menopause in a mouse model. *Fertil. Steril.* **73**: 1025–1031.
- Thaler, C.D., and Epel, D. 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 399–409.
- Van der Heijden, O.W., Essers, Y.P., Fazzi, G., Peeters, L.L., De Mey, J.G., and van Eys, G.J. 2005. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol. Reprod.* **72**: 1161–1168.
- Van Engelen, M.A.J., Nielsen, M.K., and Ribeiro, A. 1995. Differences in pup weight, pup variability within litters, and dam weight of mice selected for alternative criteria to increase litter size. *J. Anim. Sci.* **73**: 1948–1953.
- Zackrisson, U., Mikuni, M., Wallin, A., Delbro, D., Hedin, L., and Brannstrom, M. 1996. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum. Reprod* **11**: 2667–2673.



## Artículos Científicos

*Intrauterine Growth Retardation in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice is Established from Early Stages of Pregnancy* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes).  
En prensa en *Biology of Reproduction*; se corresponde con el Experimento 4.



71 BIOLOGY OF REPRODUCTION 78, 000–000 (2008)  
Published online before print 6 February 2008.  
DOI 10.1095/biolreprod.107.066159

## Intrauterine Growth Retardation in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice Is Established from Early Stages of Pregnancy<sup>1</sup>

Pilar Pallares<sup>2,3</sup> and Antonio Gonzalez-Buñes<sup>4</sup>

Unidad de Animalario,<sup>3</sup> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III,  
28029 Madrid, Spain

Departamento Reproducción Animal,<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid, Spain

C1

### ABSTRACT

72 The current study aimed to determine effects of deficiencies in nitric oxide synthase (NOS) 3 on embryo and fetal development by *in vivo*, noninvasive, real-time ultrasonographic assessment of phenotypic changes in *Nos3*-knockout pregnant mice and their wild-type counterparts. From Day 4.5 of pregnancy onwards, embryonic vesicle diameters, crown-rump length, and trunk diameter were obtained by serial scanning of seven adult pregnant female mice, strain B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1ac</sup>/J, N9 generation backcrossing with C57BL/6J mice, homozygous for the disruption of the endothelial NOS gene (group *Nos3*<sup>-/-</sup>) and 12 pregnant, wild-type C57BL/6J mice (group *Nos3*<sup>+/+</sup>). All the measurements increased in both genotypes throughout gestation. However, embryo length and width were significantly larger in *Nos3*<sup>+/+</sup> than in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice from Day 8.5, and both longitudinal and transverse diameters of the entire gestational sacs were larger in *Nos3*<sup>+/+</sup> mice from Day 10.5. Assessment of the relative growth of embryos/fetuses and gestational annexes showed different patterns between *Nos3*<sup>-/-</sup> and *Nos3*<sup>+/+</sup> mice. Throughout the pregnancy, the distance between the external limit of the gestational sac and the embryo in *Nos3*<sup>+/+</sup> mice diminished in longitudinal sections, or remained unaffected in transverse sections. In *Nos3*<sup>-/-</sup> mice, both longitudinal and transverse curves were composed of a first period of significant increase ( $P < 0.005$ ) in the difference between embryo and gestational vesicle measurement between Days 5.5 and 14.5, and a second period from Day 14.5 of pregnancy onward, in which the changes were not significant. The results demonstrate that the processes of fetal growth retardation in the *Nos3*<sup>-/-</sup> mice are established from early pregnancy stages.

74 *conceptus, early development, knockout mice, nitric oxide, pregnancy*

### INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a key mediator and regulatory agent in a wide variety of physiological functions [1]. The NO is synthesized by a family of NO synthases (NOSs), with three isoforms: neuronal constitutive (nNOS or NOS1 [type I]), inducible NOS (iNOS or NOS2 [type II]), and endothelial constitutive (eNOS or NOS3 [type III]). The NOS3-derived NO was found to be the most important vasodilator and platelet aggregation inhibitor [2]. It is now well known that NOS3 takes part in most of the female reproductive processes (reviewed in [3, 4]), acting as an important mediator of uteroplacental blood flow during pregnancy.

The study of NOS actions is currently facilitated by the existence of mouse lines deficient for each isoform (for review, see [5, 6]). Inhibition of NOS3 in *Nos3*-knockout mice has been found to cause decreased placental perfusion and creates alterations in the remodeling of the uterine artery [7]. Effects are found to be related to fetal growth retardation and higher mortality at the end of gestation [7, 8]. Thus, there is a reduction in the litter size and weight of neonates at delivery (confirmed by [9]), with increased perinatal losses [6]. The publications examining fetal growth [7, 8] report that differences in litter size and fetal development were established only at the last days of pregnancy (Day 17 p.c.). Conversely, several studies (for review, see [3, 4]) have emphasized the role of NO and NOS, and specifically NOS3, in processes of implantation and early embryonic development [10–12]. All of these analyses were done by postmortem examination at specific gestational ages; thus, the screening of the same conceptuses in successive days throughout the pregnancy is impeded.

The current study was developed to assess the effects of deficiencies in NOS3 on fetal development. For a dynamic study of conceptus development in the same animals in successive days, *in vivo* monitoring of daily changes in embryonic and fetal structures during the entire gestation was performed in *Nos3*-knockout mice and their wild-type counterparts. The screening was carried out by real-time ultrasound imaging, a well-recognized, noninvasive, and reliable method for assessment of pregnancy and fetal development in most species, including mice [13, 14], from very early pregnancy stages (Day 4.5 p.c. in mice; Pallares and Gonzalez-Buñes, unpublished results). From the data of another previously unpublished study (Pallares and Gonzalez-Buñes), values of embryo vesicle and trunk diameters and crown-rump lengths of embryos and fetuses were considered to be the most representative during the entire pregnancy. These measurements can be easily made from early pregnancy stages (Day 4.5 p.c. for vesicle and 5.5 p.c. for embryo measurements) and throughout the entire gestation. Other suitable anatomical structure measurements are the skull diameter

<sup>1</sup>Supported by Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) and Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), under the collaborative project CC07-018. CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation; INIA is supported by the Spanish Ministry of Education and Science Affairs; there was no other outside funding.

<sup>2</sup>Correspondence: Pilar Pallares, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain. FAX: 34 91 453 12 65; e-mail: ppallares@cnic.es

Received: 17 October 2007.

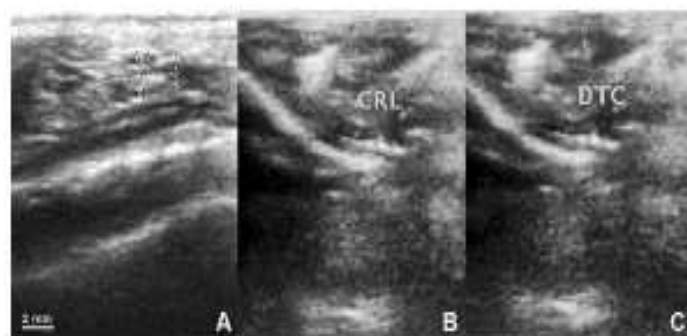
First decision: 12 November 2007.

Accepted: 30 January 2008.

© 2008 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.  
ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>



FIG. 1. Examples of ultrasonographic imaging and measurement of the gestational structures at different stages of pregnancy in *Nos3*-knockout mice. A) Longitudinal and transverse diameters of the embryonic vesicle at Day 6.5 of pregnancy. B) Crown-rump length (CRL). C) Transverse diameter (DTC) in an embryo of 5.5 days.



(occipito-snout length and biparietal and orbital diameters), umbilical cord diameter, and femur length, but only at later stages of gestation (from Day 11.5 onward) and with reliability determined by the position of the fetus.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and Husbandry

All the animals were maintained at the facilities of the Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) Animal Laboratory Unit in Madrid, Spain, which meets the requirements of the European Union for scientific procedure establishment. Aspects of pregnancies and offspring described in the literature for deficient mice had previously been found in the animals used for the trial. The experiment was carried out under project license 15607 from the CNIC Scientific Ethics Committee. Animal manipulations were performed in accordance with Spanish policy for animal protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 about the protection of animals used in experimentation.

### Ultrasonographic Morphometry of Conceptuses Development

For this study, we used a total of seven adult, pregnant, female mice, strain B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1.1</sup>/J, N9 generation backcrossing with C57BL/6J mice, homozygous for the disruption of the endothelial NOS gene (group *Nos3*<sup>-/-</sup>) and 12 pregnant wild-type C57BL/6J mice (group *Nos3*<sup>+/+</sup>); animals were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Females were mated in homozygous with B6.129P2-*Nos3*<sup>tm1.1</sup>/J and C57BL/6J males at a ratio of 1:1. Every morning for 4 days, appearance of estrus was determined by evaluating the presence of a vaginal plug as a result of overnight mating. The male was removed during the same morning that the vaginal plug was confirmed; this was considered as Day 0.5 of pregnancy.

Observations were performed starting at Day 3.5, estimated as mean day of implantation [15], to Day 18.5. In order to avoid an excessive number of consecutive observations, which might damage the mouse or its conceptus, the mice were randomly divided into two groups for observation, and each group was scanned on alternating days. Each mouse was manually restrained in dorsal recumbence for ultrasound scanning, without anesthesia, in order to avoid any effect on fetal development or organ function [16], mainly heart rate, during the observations. In order to diminish animal distress, ultrasound imaging was performed without shaving the abdominal hair; the coupling between the transducer and the skin was improved by abundantly wetting the abdomen with echocymethylcellulose gel.

Scanning was performed with two different ultrasound machines: an Aloka 2900 equipped with a multifrequency (7.5–10 MHz) sectorial array probe (XXX), and a Siemens Antares connected to a multifrequency (7.5–10 MHz) linear array probe (OOO). For viewing the uterine horns and fetus in transverse, frontal, or sagittal planes, ultrasound scanning was performed by placing the transducer on one flank and moving it to the opposite flank. Thus, the probe was manipulated until the largest section of each structure was obtained. Measurements were completed after the entire examination was recorded and the mouse released to avoid further stress arising from keeping the animal restrained. Subsequently, the size of the different structures was measured with built-in electronic calipers on the cine-loop. In order to avoid individual effects derived from compliance of the fetus, the measurements from a minimum of

three different conceptuses (range 3–5 in *Nos3*<sup>+/+</sup> and 3–7 in *Nos3*<sup>-/-</sup>), from each individual pregnancy, were taken in each scanning.

### Data Analysis

Data obtained were grouped according to the day of gestation, and a statistical study was carried out by using standard linear and quadratic analyses. Predictive regression curves for each variable were calculated by the best adjustment of data in terms of their respective determination coefficients ( $r^2$ ). The effects of genotype on correlations between day of gestation and embryonic or fetal measurements were tested by analysis of variance for repeated measures (split-plot ANOVA). The parameter values were expressed as means  $\pm$  SEM, and statistical significance was accepted for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Embryonic vesicles were identified from Day 4.5 post-vaginal plug and throughout the entire pregnancy (Fig. 1). The longitudinal diameters of the embryonic vesicle increased exponentially (Fig. 2A) from the first visualization to Day 18.5, both in *Nos3*<sup>-/-</sup> ( $y = 2.2068e^{0.1208x}$ ,  $r^2 = 0.674$ ;  $P < 0.0005$ ) and *Nos3*<sup>+/+</sup> ( $y = 2.8702e^{0.1132x}$ ,  $r^2 = 0.671$ ;  $P < 0.0005$ ), the measurements being significantly higher in *Nos3*<sup>+/+</sup> from Day 10.5 ( $10.0 \pm 0.3$  vs.  $7.7 \pm 0.2$ ;  $P < 0.0005$ ). The transverse diameter of the gestational sac also increased exponentially (Fig. 2B) for both groups (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 1.3913e^{0.133x}$ ,  $r^2 = 0.723$ ;  $P < 0.0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1.4274e^{0.1254x}$ ,  $r^2 = 0.652$ ;  $P < 0.0005$ ). The values were higher in *Nos3*<sup>+/+</sup> from Day 10.5 ( $5.8 \pm 0.2$  vs.  $4.8 \pm 0.1$ ;  $P < 0.005$ ).

The crown-rump length and trunk diameter of the embryos and fetuses were measured from Day 5.5 to Day 18.5 of gestation (Fig. 3). The evolution of the crown-rump length was exponential in both groups (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 1.5149e^{0.1053x}$ ,  $r^2 = 0.776$ ;  $P < 0.0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1.4274e^{0.1254x}$ ,  $r^2 = 0.652$ ;  $P < 0.005$ ), like the trunk diameter (*Nos3*<sup>-/-</sup>:  $y = 0.6971e^{0.1089x}$ ,  $r^2 = 0.783$ ;  $P < 0.0005$ ; *Nos3*<sup>+/+</sup>:  $y = 1.2392e^{0.0952x}$ ,  $r^2 = 0.588$ ;  $P < 0.0005$ ). Differences between genotypes in both parameters were found from Day 8.5 of pregnancy (for crown-rump length:  $5.5 \pm 0.5$  vs.  $4.6 \pm 0.3$ ;  $P < 0.005$ ; and for trunk diameter:  $2.9 \pm 0.1$  vs.  $2.0 \pm 0.1$ ;  $P < 0.005$ ).

From these results, subsequent analysis regarding the relative growth of embryos/fetuses and gestational annexes showed different patterns between *Nos3*<sup>-/-</sup> and *Nos3*<sup>+/+</sup>. In the control, *Nos3*<sup>+/+</sup>, the distance between the external limit of the gestational sac and the embryo diminished throughout the pregnancy (in longitudinal sections; Fig. 4A) or remained unaffected (in transverse sections; Fig. 4B). In the defective genotype, *Nos3*<sup>-/-</sup>, there was a trend to an increase throughout the gestation, both in longitudinal and transverse sections. In fact, both longitudinal and transverse curves are composed of

## PALLARES AND GONZALEZ-BULNES

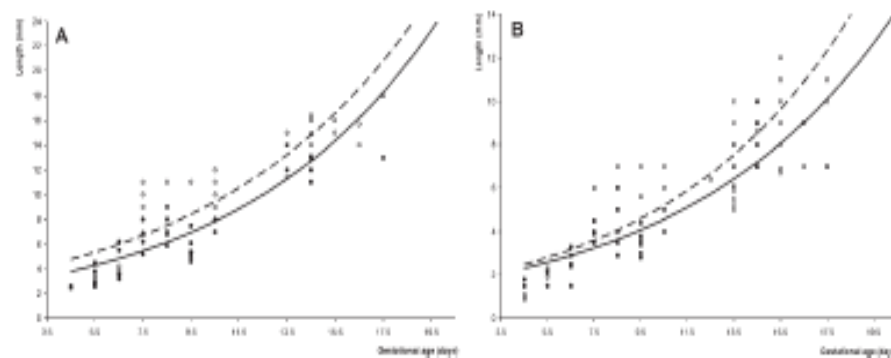


FIG. 2. Regression curve showing the relationship of the longitudinal (A) and transverse (B) diameters of the embryonic vesicle with gestational age in *Nos3*-knockout mice (*Nos3*<sup>-/-</sup>, solid circles, solid line) and wild-type controls (*Nos3*<sup>+/+</sup>, open circles, dashed line).

an initial period of significant increases in the difference between embryo and gestational vesicle measurement (Days 5.5 to 14.5 p.c.; longitudinal:  $r^2 = 0.752$ ;  $P < 0.005$ ; transverse:  $r^2 = 0.772$ ;  $P < 0.005$ ), and a second period, from Day 14.5 of pregnancy onward, in which the changes were not significant.

## DISCUSSION

Our current data offer, for the first time, the in vivo daily screening of conceptus development in *Nos3*-knockout mice compared with their wild-type counterparts. These results clearly demonstrate, contrary to previous reports, that processes of fetal growth retardation described for the *Nos3*<sup>-/-</sup> mice are established from the early stages of pregnancy.

The comparison of growth curves between *Nos3*<sup>-/-</sup> and *Nos3*<sup>+/+</sup> mice showed differences from the very first observations. However, growth retardations in the development of the embryo and the entire gestational sac were found to reach statistical significance later, from Days 8.5 and 10.5 of pregnancy, respectively. In the mouse, at Day 8.5 of pregnancy, the development of the embryonic heart and the yolk sac blood circulation commences [17]; blood islands within the yolk sac originate both endothelial and hematopoietic cells [18]. This is a crucial period for the embryo, during which gastrulation takes place [19]. Gastrulation is the process by which the three primary germ layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm) are established. Gastrulation also generates the

extraembryonic mesoderm, which differentiates into the allantois and the mesodermal components of the chorion, amnion, and visceral yolk sac. Thus, our data confirms, in vivo, previous reports from in vitro studies regarding the importance of NO and NOS in early pregnancy. From these earlier studies, it is known that embryos with inhibition for the NOS enzyme become developmentally delayed or nonviable [10]. This fact has been related to the finding that nutrition of the embryos, before completion of the placenta, is achieved by phagocytic activity of the trophoblast [20, 21], activity which is mediated by reactive oxygen species [22]. During implantation, dilation of uteroplacental arteries is induced by NOS3 from the extravillous trophoblast [23]. Subsequently, in the post-implantation period and during early placental development, the NO released by trophoblast NOS3 is hypothesized to be involved in tissue remodeling, immunosuppression, and vasoregulation [11], thus contributing to the maintenance of vasodilation and to the prevention of coagulation necessary for the success of the early pregnancy [12].

Our findings, although coincidental with the studies cited above, are contradictory to previous works reporting that differences in fetal growth are only established at the end of pregnancy [7, 8]. A possible explanation for these differences may be related to the number of animals used or to the fact that these studies were only performed in late gestation (from Day 15 of pregnancy). Also, when compared postmortem, the fetal weight, and not the usual fetometric indexes (lengths and diameters of embryo/fetal head and body), were used for

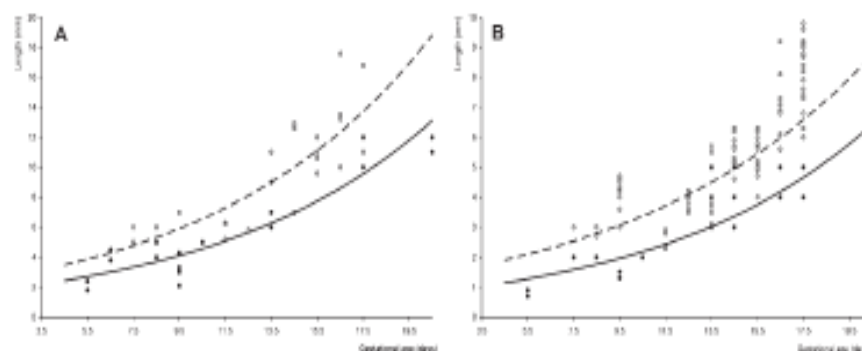


FIG. 3. Regression curve showing the relationship of the embryo crown-rump length (A) and trunk diameter (B) with gestational age in *Nos3*-knockout mice (*Nos3*<sup>-/-</sup>, solid circles, solid line) and wild-type controls (*Nos3*<sup>+/+</sup>, open circles, dashed line).



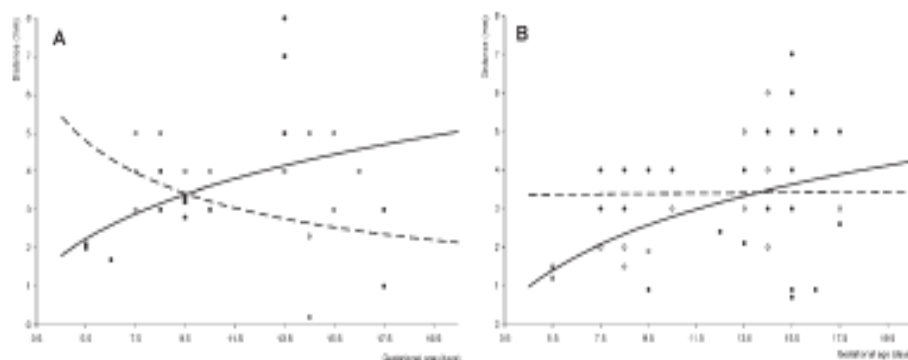


FIG. 4. Regression curve showing the relationship of the relative measurement of embryos/fetuses and gestational annexes, in longitudinal (A) and transverse (B) sections, with gestational age in *Nos3*-knockout mice (*Nos3*<sup>-/-</sup>, solid circles, solid line) and wild-type controls (*Nos3*<sup>+/+</sup>, open circles, dashed line).

estimating conceptus development. From classical studies in other species, we know that the morphometric values obtained in later gestation are affected by the litter size and by individual characteristics of the fetus. These characteristics are determined both by genetic [24] and/or nutritional factors [25], with different effects on fetal weight than on fetal length or development [26, 27]. Moreover, it is essential to distinguish fetal growth from weight at term or at birth. Fetuses with the same weight may have had different growth trajectories that can only be elucidated by repeated ultrasonographic measurement throughout pregnancy [28]. These considerations may also be valid for mice. The study by Heffer et al. [8] was performed at Days 15 and 17 of pregnancy. The work of Van der Heijden et al. [7], although only giving data on embryonic weight at Day 17 and not before, reported abnormalities in the structural and cellular characteristics of the uterine artery between Days 5 and 11 of pregnancy in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice, which coincides with the critical period identified in our study.

In the present study, differences between *Nos3*<sup>-/-</sup> and *Nos3*<sup>+/+</sup> mice were not only found in the size of embryos and vesicles, but also in the growth dynamics of both structures. The comparison of the relative growth of embryos/fetuses and gestational annexes showed different patterns between *Nos3*<sup>-/-</sup> and *Nos3*<sup>+/+</sup> mice. In the control wild-type mice, the increase of the structures throughout pregnancy is synchronous; in the mice defective for NOS3, the growth of the embryo is slower than that of its membranes and placenta for the first 14.5 days of pregnancy. In the mouse, this is the period of transition between the stages of late embryo and early fetus [29]. Possible causes for these changes in the relative size of embryos/fetuses and annexes are related to processes of intrauterine growth retardation (IUGR), preeclampsia, hydramnios, and/or hydroallantois. However, the accumulation of fluid may be discounted, as it is accompanied by a significant increase of gestational sac size. Conversely, the size of the embryo vesicle decreased in *Nos3*<sup>-/-</sup> mice. Possible implications of IUGR and/or preeclampsia syndromes seem to be reinforced by the fact that deleterious effects were found initially in the embryo and subsequently in the annexes. Both syndromes, IUGR and preeclampsia, are linked. In preeclampsia, uteroplacental blood flow is compromised [30], leading to fetal growth restriction [31]. Thus, several studies indicate that a relative deficiency of placental NO synthesis is a predisposing factor for preeclampsia [30, 32, 33] and IUGR [34].

IUGR is a significant health concern in human medicine, being associated with mortality and morbidity during infancy

and susceptibility to disease during adulthood, primarily showing coronary diseases, hypertension, and diabetes [35]. IUGR, both in humans and in animal models, has been found to develop into different types, and to differing degrees of severity. First, IUGR fetuses may be classified as "symmetrical" or "asymmetrical" (for review, see [36]). Symmetrical IUGR is characterized by a uniform reduction of the fetus and its organs from early pregnancy, and is associated with genetic and infectious factors. Asymmetrical IUGR is characterized by a reduction in size in some organs, while the remaining organs are normal. It is also associated with insufficient nutritional delivery to the fetus by maternal or placental factors during late gestation, when the requirements of the fetus are higher. Symmetrical IUGR is scarce, while asymmetrical IUGR is more abundant; thus, most studies have focused on asymmetrical IUGR. The inconveniences of research in humans led to the development of animal models, mainly rodents and sheep, for studies of maternal malnourishment and placental malfunction during late gestation [28, 36, 37].

Nevertheless, there is emerging evidence of the importance of adequate development of embryos during early pregnancy. Alterations around the time of conception, implantation, and early development may affect not only pregnancy establishment by immediate effects, but also fetal, neonatal, and adult development [38–41], leading to low birthweight, premature births [42], and, later, metabolic, nervous, and cardiovascular diseases [43]. These effects are related to genetic and infectious factors [36], but also to nutritional challenges [42, 44, 45] and, mainly, maternal body composition during early pregnancy [46], which, in cows, has been described to be influenced by weight, age, and parity [47]. Coincidentally, incidence of reproductive alterations and fetal programming in NOS3 mice has also been related to parity [9]. Linking early pregnancy, NOS3, and later fetal programming, recent studies have found that placental NOS3 concentration, mainly regulated at mid-gestation, but also during early and late gestation [48], is influenced by challenges in early gestation [49], equivalent in this current study to the fifth to eighth weeks of pregnancy in humans [50].

In conclusion, our current results demonstrate that the processes of fetal growth retardation in the *Nos3*<sup>-/-</sup> mouse are established from early pregnancy stages.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors appreciatively thank Dr. J. M. Redondo for cession of the mice used in this experiment and the staff of CNIC Animal Unit for skilled

## PALLARES AND GONZALEZ-BULNES

technical assistance. The help from A. Vidaurazaga (Aloka España, Madrid, Spain) and I. Cisneros (RX Cisneros Electromedicina, Madrid, Spain) in providing different ultrasound machines and probes is also acknowledged.

## REFERENCES

- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-237.
- Huang PL, Huang Z, Maehino H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377:239-242.
- Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 2003; 9:359-380.
- Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des* 2003; 9:399-409.
- Maehino H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 277:745-750.
- Gregg RA. Mouse models and the role of nitric oxide in reproduction. *Curr Pharm Des* 2003; 9:391-398.
- Van der Heijden OW, Evers YP, Facchi G, Pentens LL, De Mey JG, van Eys GI. Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2005; 72:1161-1168.
- Heller LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* 2001; 64:666-673.
- Longo M, Jain V, Langenfeld J, Vlodavets YP, Garfield RE, Harkins GD, Anderson GD, Saade GR. Enhanced growth and improved vascular function in offspring from successive pregnancies in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1470-1476.
- Gouge RC, Marshburn P, Gendon BE, Nunley W, Hunt-Hackman YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998; 58:875-879.
- Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Human Reprod* 1999; 5:467-475.
- Gaglioti S, Scavone C, Bevilacqua E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod* 2000; 62:260-268.
- Brown SD, Zurekowski D, Rodriguez DP, Dunning PS, Hurley RJ, Taylor GA. Ultrasound diagnosis of mouse pregnancy and gestational staging. *Comp Med* 2006; 36:262-271.
- Russo M, Meunier L, Gao A, Catone G, Cochran N, Tortora G, Brunetti A. Pregnancy detection in mice using ultrasound. *Vet Record* 2007; 160:446-447.
- Kaufman MH. *Atlas of Mouse Development*. London: Academic Press Ltd; 1989.
- Macco RL, Wilson AI, Rice SA, Baden JM. Fetal development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* 1985; 32:339-345.
- Chen LT, Hsu YC. Development of mouse embryos in vitro: preimplantation to the limb bud stage. *Science* 1982; 218:66-68.
- Flammie I, Fredlich T, Riise W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997; 173:206-210.
- Boucher DM, Palenik RA. Induction and differentiation of extra-embryonic mesoderm in the mouse. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8:765-777.
- Schlesinger M, Koren Z. Mouse trophoblast cells in tissue culture. *Fertil Steril* 1975; 18:95-101.
- Pavia CS. Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. *J Infect Dis* 1983; 147:1006-1010.
- Gaglioti S, Colapiccolo P, Bevilacqua E. Reactive oxygen species and phagocytosis process of hemochorial trophoblast. *J Repr Assoc Adv* 1996; 48:37-42.
- Namiev A, Chwalisz K, Frank HG, Kolnen O, Heggie-Hartung C, Kaufmann P. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res* 1995; 282:407-421.
- Stephenson SK, Lambourn LJ. Prenatal growth in Romney X Southdown cross and Australian Merino sheep. *Aust J Agric Res* 1980; 21:1044-1063.
- Richardson C. Morphological parameters of intrauterine growth retardation in the newborn lamb. *Vet Record* 1976; 101:151-152.
- Wenham G. A radiographic study of early skeletal development in fetal sheep. *J Agric Sci Camb* 1981; 96:39-44.
- Wenham G. A radiographic study of the changes in skeletal growth and development of the fetus caused by poor nutrition in the pregnant ewe. *Br Vet J* 1981; 137:176-187.
- Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Intern J Epidemiol* 2001; 30:15-23.
- Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Anat Histol Embryol* 1973; 2:11-45.
- Vlodavets Y, Saade GR, Garfield RE. Vascular reactivity in pre-eclampsia. *Semin Perinatol* 1999; 23:34-44.
- Xiao R, Sorenson TK, Williams MA, Luthy DA. Influence of pre-eclampsia on fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13:145-146.
- Baylis C, Reinder E, Suto T, August P. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Semin Nephrol* 1998; 18:238-250.
- Buhmicheir IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998; 4:25-42.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- Barker DJP. *Mothers, Babies and Health in Later Life*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998.
- Anthony RV, Schaeffer AN, Wright CD, Regnault TR. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl* 2003; 61:183-194.
- Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod Suppl* 2003; 61:195-206.
- Edwards LJ, McMillen IC. Impact of maternal undernutrition during periconceptional period, fetal number, and fetal sex development of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod* 2002; 66:1562-1569.
- Gardner DS, Van Bon BW, Dandrea J, Goddard PJ, May SF, Wilson V, Stephenson T, Symonds ME. Effect of periconceptional undernutrition and gender on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in young adult sheep. *J Endocrinol* 2006; 190:203-212.
- Gardner DS, Buttery PJ, Daniel Z, Symonds ME. Factors affecting birth weight in sheep: maternal environment. *Reproduction* 2007; 106:307-312.
- Symonds ME, Stephenson T, Gardner DS, Budge H. Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:53-63.
- Bloomfield FH, Oliver MH, Hawkins P, Campbell M, Phillips DJ, Gluckman PD, Challis RG, Harding JE. A periconceptional nutritional origin for noninfectious preterm birth. *Science* 2003; 300:606.
- Gopalkrishnan G, Gardner DS, Dandrea J, Langley-Evans SC, Pearce S. Influence of maternal pre-pregnancy body composition and diet during early-mid pregnancy on cardiovascular function and neuron number in juvenile sheep. *Br J Nutr* 2005; 94:938-947.
- Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, Walker RM, Ramsey MM, Stephenson T, Symonds ME. Per-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension* 2004; 43:1290-1296.
- Martin GB, Rodger I, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16:491-501.
- Oliver MH, Hawkins P, Harding JE. Periconceptional undernutrition alters growth trajectory and metabolic and endocrine responses to fasting in late-gestational fetal sheep. *Pediatr Res* 2005; 57:591-598.
- Flinn SA, Wattiaux MA. Effects of parity and supply of non-m-degraded and undegraded protein on production and nitrogen balance in Holsteins. *J Dairy Sci* 2005; 88:2096-2106.
- Zobel HT, Galan HL, Anthony RV, Regnault TR, Parker TA, Arroyo JA. Ontogeny of endothelial nitric oxide synthase mRNA in an ovine model of fetal and placental growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:420.e1-420.e5.
- Arroyo JA, Anthony RV, Parker TA, Galan HL. Differential expression of placental and vascular endothelial nitric oxide synthase in an ovine model of fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:771-777.
- Otis EM, Brent R. Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec* 1954; 120:33-63.



## Artículos Científicos

*In Vivo Virtual Histology of Mouse Embryogenesis by Ultrasound Biomicroscopy and Magnetic Resonance Imaging* (Pilar Pallares, María E. Fernandez-Valle y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en *Molecular Imaging and Biology*; incluye datos relacionados con actividades previas y el Experimento 5.



## Molecular Imaging &amp; Biology



**In Vivo Virtual Histology of Mouse Embryogenesis by Ultrasound  
Biomicroscopy and Magnetic Resonance Imaging**

Journal:	<i>Molecular Imaging &amp; Biology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Categories:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pallares, Pilar; CNIC Fernandez-Valle, Maria E Gonzalez-Bulnes, Antonio
Keywords:	Conceptus, Magnetic-resonance, Morphogenesis, Mouse, Pregnancy, Ultrasound-biomicroscopy







## In Vivo Virtual Histology of Mouse Embryogenesis by Ultrasound Biomicroscopy and Magnetic Resonance Imaging

Pilar Pallares<sup>1</sup>, Maria E. Fernandez-Valle<sup>2</sup> and Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Melchor Fernandez Almagro 3. 28029-Madrid, Spain.

<sup>2</sup> CAI de RMN, UCM, Madrid, Spain..

<sup>3</sup> Dpto. de Reproduccion Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid, Spain.

### Abstract

*Purpose:* Assessment of the feasibility of magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasound biomicroscopy (UBM) for sequential in vivo virtual histology of mouse embryo development.

*Procedures:* A first experiment compared MRI (4.7 T) and UBM (40 MHz) for phenotyping C57BL/6J embryos between Days 6.5 and 13.5 of pregnancy. A second experiment, based on the results of the first, determined the feasibility of UBM for in vivo microscopic imaging of morphogenesis from implantation (Day 4.5) to the late embryo stage (Day 15.5).

*Results:* Pregnancy was visualized with both techniques at all stages analyzed. MRI scanning at later stages (Days 11.5-13.5) allowed imaging of the entire uterus and all gestational sacs and embryos inside. The small scanning range of UBM precluded accurate counting of fetuses; however, its high resolution identified the decidual reaction at implantation sites from Day 4.5. At later stages, it was possible to assess key morphogenetic processes such as differentiation of the placenta, the cephalic region, the thoracic and abdominal organs, the skeletal system and the limbs. UBM was especially good at imaging dynamic structures such as the cardiovascular system.

*Conclusions:* Both techniques are reliable for in utero imaging of litter features and phenotypic changes during mouse embryo development. MRI may be the favored method for studying embryo lethality and intrauterine growth retardation, because the entire uterus can be viewed and all embryos identified. UBM has potential application in studies of cellular components of organs and tissues and assessment of hemodynamic changes in the circulatory system.

*Keywords:* Conceptus; Magnetic-resonance; Morphogenesis; Mouse; Pregnancy; Ultrasound-biomicroscopy.

Corresponding author: Pilar Pallares. Phone: 00 34 91 453 12 02. FAX: 0034 91 453 12 65.  
E-mail: ppallares@cnic.es (P. Pallares)

### Introduction

The mouse, whether wild-type or genetically-modified, is a widely used model in research in biomedicine and developmental biology [1, 2]. Studies have traditionally been based on histological observation after necropsy or surgery. An immense body of knowledge has been amassed through the use of this technique; however, its highly invasive nature makes it inappropriate for sequential dynamic studies on the same animal. A technique allowing sequential observations on successive days would be a major advance in fields such as embryogenesis, in which phenotypic changes are continual and rapid [3]. Such a technical

advance would also improve animal care, by reducing the number of experimental animals used and refining studies in accordance with Russell and Burch's 3Rs model (refinement, reduction and replacement; [4]).

A potential means of conducting dynamic studies in mice is the use of non-invasive imaging methods, such as used in humans and other large mammal species. An additional advantage of this approach is that, by using the same diagnostic and observational techniques as used in clinical practice, it would be especially applicable to translational studies. Magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasonography (US) are the strongest candidates, since both enable direct viewing and are ideal for the study of soft tissues. Moreover, both allow three-dimensional representation of embryos from data collected directly from intact specimens; so no artifacts are introduced by the physical deconstruction of the specimen as occurs in histological studies [5]. For histological studies, embryos must first be sliced, stained and photographed before three-dimensional reconstruction; this has tended to limit such studies to early-stage embryos (9 days post-coitum; [6]) because of the difficulties of sectioning late-stage embryos and the large number of sections needed. Despite these limitations, the combined use of advanced microscopy imaging techniques and software has allowed the production of an outstanding digital atlas of mouse embryogenesis, developed in the Edinburgh Mouse Atlas Project by the Medical Research Council and the University of Edinburgh (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk>)

MRI offers the possibility of imaging specimens without a need for complex image treatment [5, 7-10]. MRI has been successfully used to create atlases of mouse embryo development, a good example being the Caltech  $\mu$ MRI Atlas of Mouse Development of the California Institute of Technology (<http://mouseatlas.caltech.edu>). However, MRI requires the animal to be anaesthetized during long observation periods, which limits the possibility of serial studies on successive days and sometimes jeopardizes the survival of the animals used. MRI studies of mouse development are therefore scarce, and most have been limited to ex vivo examination [5, 9, 10] or to a very restricted number of scans during each pregnancy [7, 8].

US enables surveillance and measurement of mouse embryo development from Day 4.5 p.c. to near delivery. The examination procedure is easy and fast to perform, with no need for anesthesia, thus favoring animal wellbeing and allowing serial ultrasonographies on successive days [11]. US has been successfully applied to the study of morphogenesis in wild-type and mutant embryos [12]. Moreover, US enables viewing in real-time; hence, movements inside the gestational sac can be recorded, which is especially advantageous when studying the morphogenesis of dynamic structures such as the cardiovascular system.

However, the maximum frequencies reached by conventional US probes are 10-15 MHz. This provides a spatial resolution in the order of millimeters, adequate for a macroscopic study of the embryo but insufficient for visualizing microscopic details in individual tissues. Higher resolution can be achieved by the use of ultrasound biomicroscopy (UBM), which is an ultra-high frequency (30-55 MHz) pulse-echo method. The high frequencies generate images with a resolution of 30-50  $\mu$ m, close to conventional histology. UBM has been successfully used for real-time micro-imaging in mice [13]. However, as with MRI, to date UBM has mostly been used for static, often ex vivo observations rather than for sequential dynamic studies.

The aim of this study was to determine the accuracy and practical potential of both UBM and MRI for microscopic imaging of mouse embryonic morphogenesis in utero. Two experiments were performed consecutively. The first was developed from our previous studies on mutant mice, in which implantation failure was detected in the first scan on Day 6.5 of pregnancy (unpublished data), and where the interval between Days 8.5 and 13.5 was identified as a critical stage associated with increased embryo mortality (unpublished data)

and retarded conceptus development [12]. Thus, the first experiment aimed to compare the efficiency and reliability of UBM and MRI for in utero imaging of litter features and phenotypic changes during this period. The second experiment was built on the results of the first and aimed to determine the feasibility of UBM for in vivo microscopic imaging of embryo features from implantation to the end of organogenesis; the ultimate objective being to establish the potential of this technique for dynamic morphogenetic studies of different organs and systems.

## Material and Methods

### *Animals and husbandry*

A total of 22 pregnant C57BL/6J mice were used. All animals were maintained at the CNIC Animal Unit in Madrid, Spain, which meets European Union regulations regarding the use of animals for experimental and other scientific purposes. The study was carried out under Project License 156/07 from the CNIC scientific ethics committee. Animal manipulations were performed in accordance with Spanish policy for animal protection (RD1201/05), which meets the requirements of European Union directive 86/609 regarding the protection of animals used for experimentation.

### *Experimental design*

#### Experiment 1. Efficiency of UBM and MRI for in utero imaging of embryonic structures

Females were hormone-treated to synchronize estrus and ovulation, following a procedure routinely used by our group. Briefly, on Day -3 animals were given one intraperitoneal injection (0.5 µg) of a prostaglandin analogue (cloprostenol, Estrumate, Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Germany) and one subcutaneous injection (3 µg) of progesterone (4-pregnen-3,20-dione, Siemsgluss Iberica, Barcelona, Spain) in saline. On Day 0, dams were given a second intraperitoneal injection of 0.5 µg cloprostenol and placed with males at a ratio of 1:1. Pregnant females were identified by the presence of a vaginal plug after overnight mating, and gestational stage was estimated by defining the morning of that day as Day 0.5.

The comparative study of MRI and UBM was performed in dams carrying embryos at Days 6.5, 8.5, 11.5, 12.5, 13.5 and 14.5 (i.e.: Theiler stages, TS 9, 13 and 19-23 [3]). Mice were anesthetized with isoflurane vapor to minimize stress and breathing movements during scans. Ultrasound scans can in fact be performed without anesthesia, with the mouse restrained by hand [11]; however, here all females were anesthetized to ensure the use of the same conditions for both techniques. MRI and UBM scans were performed as described below. Endpoints considered were the ease of determining the number of embryos/fetuses and gestational structures that could be reliably imaged.

#### Experiment 2. Feasibility of UBM for in vivo microscopic imaging of embryonic structures from implantation to the end of organogenesis.

Gestational age in the study group was synchronized as in experiment 1. To determine the utility of UBM in dynamic phenotypic studies of fetal organs and systems, each pregnant animal was scanned every day, starting on Day 4.5 of pregnancy and continuing to Day 15.5 (TS 6 to 24). Gestational periods were thereafter divided into early post-implantation, organogenesis completion, and late-embryo, in accordance with previously established criteria [14, 15].

### *Magnetic resonance imaging*

MRI was performed with a BIOSPEC BMT 47/40 scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 Teslas, equipped with an 11.2 cm actively shielded gradient system, and capable of a gradient strength of 200 mT/m and a rise time of 80  $\mu$ s.

During scans, the isoflurane-anesthetized animals were monitored with an MR compatible respiration sensor, which in some experiments was used to trigger image acquisition. Animals were placed in prone position on a home-made 10 cm shaped surface RF coil.

First, global shimming was performed, and then three scout images in axial, sagittal and coronal directions were acquired using a T1 weighted spin echo sequence (TR/TE = 200/10 ms). After this, two 3D T2 weighted fast spin-echo scans in coronal direction were performed. The first was centered in the abdominal area and the second imaged the whole mouse. For the first scan, the FOV was 4x4x2 cm<sup>3</sup> and the acquisition matrix size was 256x128x64 points. The acquired data were zero filled to double the number of time points in the first and second phase encoding directions, yielding a matrix of 256x256x128 points. The image resolution was 156  $\mu$ m in all three directions. In the second scan, the FOV was 8x4x2 cm<sup>3</sup> and the acquired matrix size was 256x128x64 points. The data were not zero-filled, so the image resolution was 312  $\mu$ m in the three directions. The repetition time (TR) for these experiments was 2100 ms and the effective echo time (TE) was 80 ms. Acquisition time for each 3D experiment was 18 min.

To obtain 3D views, the maximum intensity projection (MIP) algorithm was applied to reconstructed data. This procedure was carried out using the ParaVision package (Bruker, Ettlingen, Germany).

### *Ultrasound biomicroscopy*

For UBM scanning, each dam was maintained in dorsal recumbence, either by manual restraint, or in a metal cradle when anesthetized. Coupling between skin and transducer was improved by waxing the abdominal hair and thereafter abundantly wetting the abdomen with carboxymethylcellulose gel.

Scans were performed with a Vevo 770 machine (Visual Sonic Inc., Toronto, Canada) equipped with a 40 MHz probe. UBM was done by placing the transducer on one flank and moving it to the opposite flank, to view the uterine horns and fetus in transverse, frontal and sagittal planes. Once conceptuses were located, the probe was manipulated until the largest sectional views of each structure were obtained. For detailed observation, scans were recorded using the “cine-loop” function of the apparatus.

### *Validation of MRI and UBM observations*

After scans, the anesthetized pregnant mice were humanely killed by cervical dislocation. A midline laparotomy was performed to expose the uterus, which was removed and placed in a Petri dish (Nunclon<sup>TM</sup>, Nunc International, Roskilde, Denmark) containing phosphate-buffered saline. Immediately, at least two gestational sacs from each female were thoroughly dissected with fine scissors and observed and photographed using a stereoscopic microscope (Leica MZ12.5, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

## Results

### *Efficiency of UBM and MRI for in utero imaging of embryonic structures*

With both techniques, visualization of structures congruent with pregnancy was possible at first observation on Day 6.5 (TS 9). The images obtained show the gestational sacs, in which can be discerned an advanced endometrial reaction and the presence of the embryo (Fig. 1). Similar images of the embryo vesicle were obtained at Day 8.5 (TS 13) by MRI, but with UBM it was possible to discern details of the embryo and its membranes during the process of axial rotation at this stage. Similarly, MRI scans at later stages (Days 11.5-13.5; TS 19-22) clearly showed embryos and placentas inside the gestational sacs, but the microscopic resolution of UBM revealed details of embryonic anatomy (Fig. 2).

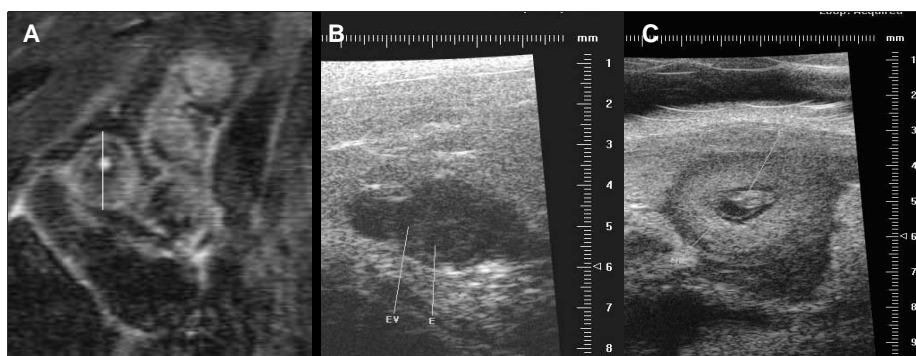


Figure 1. Images generated by MRI (A) and UBM (B and C) of embryonic vesicles. A and B show vesicles on Days 6.5 of pregnancy (TS 9); it is possible to identify the endometrial reaction, the embryonic ectoderm and the proamniotic canal. C shows vesicles on Day 8.5 (TS 13); the embryo, amnion and yolk sac cavity can be clearly distinguished.

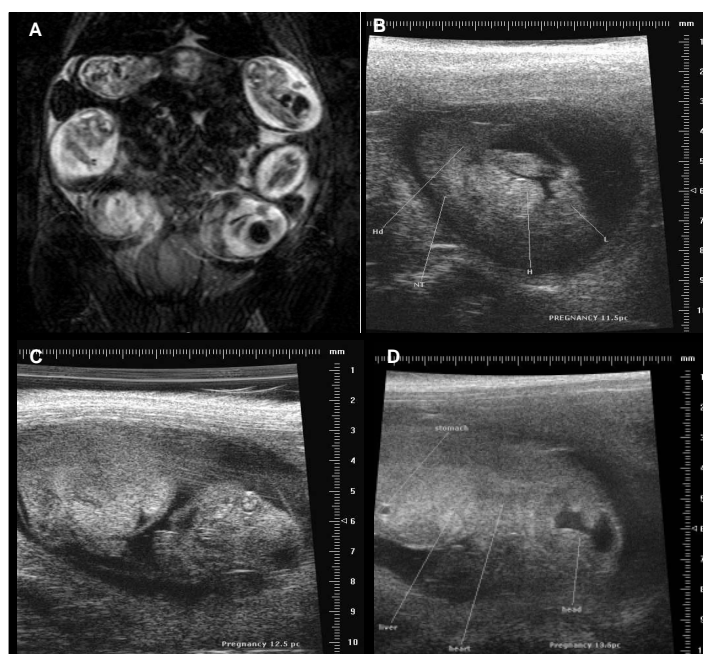


Figure 2. A) MRI imaging of a 12.5 day (TS 21) pregnancy in which the embryo inside the vesicle can be clearly distinguished. (B-D) Detailed UBM imaging of B) Day 11.5 (TS 19) embryo, showing the cephalic region (Hd), the neural tube (NT), the pericardial region (H) and the hindlimb (L), C) Day 12.5 (TS 21) embryo, showing the head, eye retina and lens (1), the left forelimb bud (2) and thoracic and abdominal organs (3) and D) Day 13.5 (TS 22) embryo, showing the mesencephalic vesicle and the third ventricle (head), the cardiac primordium (heart) the hepatic primordium (liver) and the stomach.

On the other hand, a relative disadvantage of UBM is the small exploration range, which impedes accurate determination of litter size. The ability of MRI to image the entire body of the pregnant animal, particularly when using the 3-D option, make it the technique of choice for accurate counting of the number of conceptuses (Fig. 3).

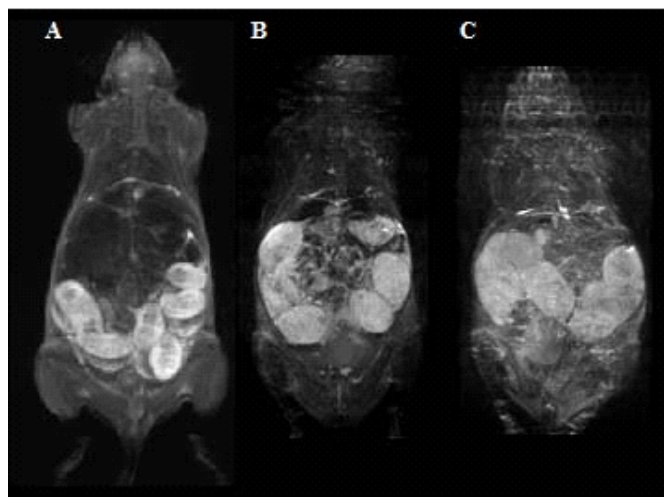


Figure 3. 3-D MRI of a mouse from Day 11.5 to 13.5 of pregnancy (TS 20-22, from A to B); the ability to image the entire uterus allows the number of embryo vesicles to be accurately determined.

*Feasibility of UBM for in vivo microscopic imaging of embryonic structures from implantation to the end of organogenesis*

In the sequential study by UBM, pregnancy was detectable from first observation at Day 4.5 (TS 6); the image was characterized by the presence of spherical structures corresponding to the decidual reactions at implantation sites (Fig. 4). By Day 5.5, embryo vesicles enlarged, and endometrial reactions were more evident from this stage, particularly on Days 6.5 and 7.5 (TS 7-11), when embryos and membranes started to become clearly differentiated. The period between Days 8.5 and 9.5 (TS 12 and 14) coincides with the process of embryo axial rotation, or “turning”, by which the embryo adopts the characteristic “fetal” position. This transition could be assessed by UBM. This was also the stage at which beating movements in the heart primordium and umbilico-placental perfusion were first detected.

The period of organogenesis completion, between Days 10.5 and 12.5 (TS 17-21) was characterized by profound changes in the UBM images of embryos (Fig. 5). These changes were seen mainly in the cardiovascular system, because of the blood circulation and the enlargement of the heart, and in the cephalic region, which is larger than the rest of the embryo and is composed of cavities (mesencephalic, telencephalic, optic and otic vesicles and the fourth ventricle).

The period from Day 13.5 to 15.5 (TS 22-24) was mainly characterized by the adoption of an “adult” aspect by the embryonic organs and external features and by the initiation of ossification in the skeletal system (Fig. 6). UBM was especially useful in this period for visualizing key biological processes: for example, inter-atrial and inter-ventricular septation and the appearance of the heart valves, the differentiation of the eye, and the interdentation of handplates and footplates to give rise to the digits.

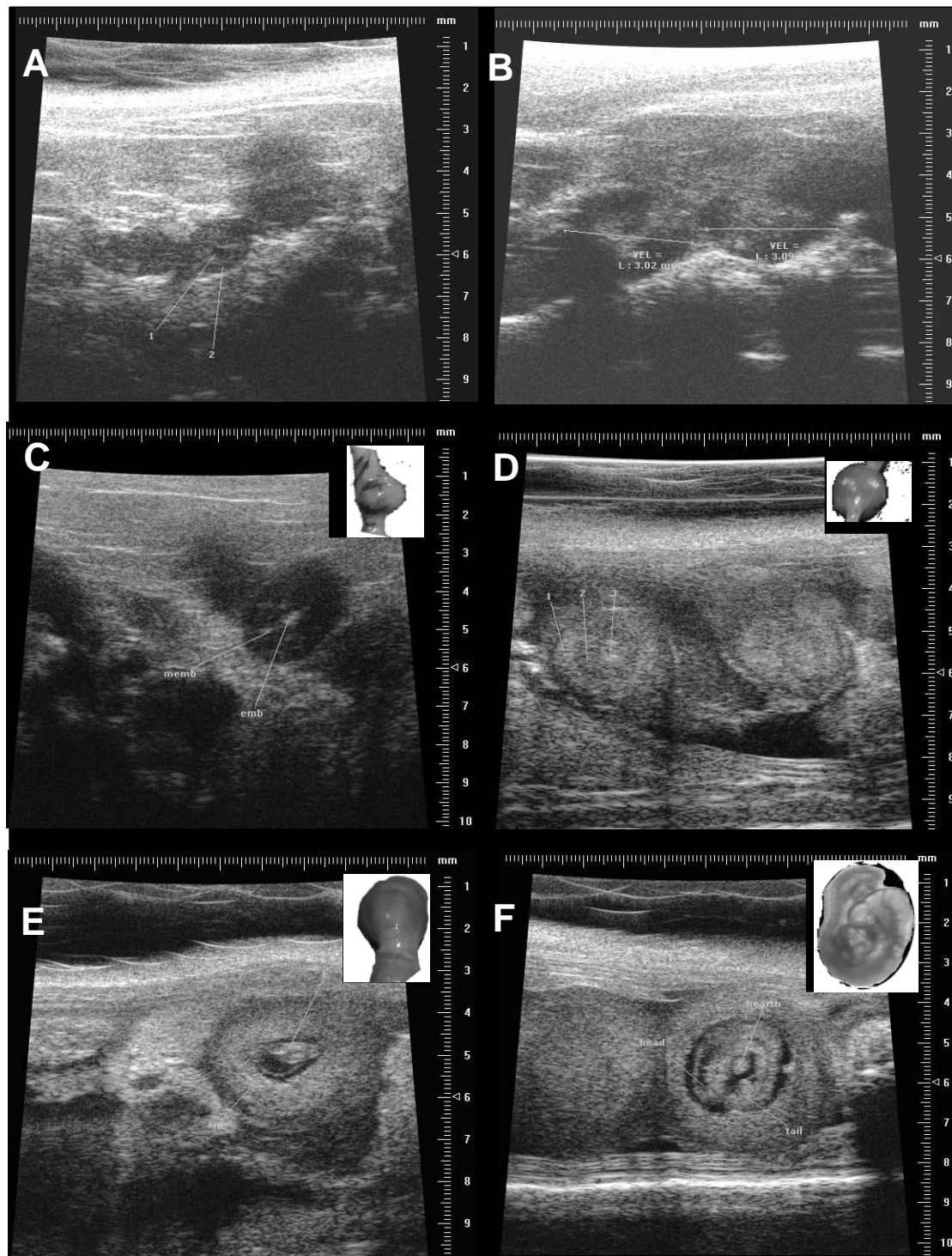


Figure 4. UBM imaging of the early post-implantation period, from embryo implantation to axial rotation (Days 4.5-9.5; TS 6-14). The earliest image scans are characterized by spherical structures corresponding to the decidual reaction at implantation sites on Days 4.5 and 5.5 (TS 6 and 8; A and B, respectively). On Day 6.5 (TS 9; C), embryo (emb) and membranes (memb) begin to be clearly distinguishable; and on Day 7.5 (TS 11; D), the extra-embryonic mesoderm of the visceral yolk sac (1), the exocoelomic cavity (2) and the embryo (3) are clearly identifiable. Embryos underwent axial rotation, or “turning”, and significantly increased in size, between Days 8.5 and 9.5 (TS 12 and 14; E and F), when the heart primordium can be identified.



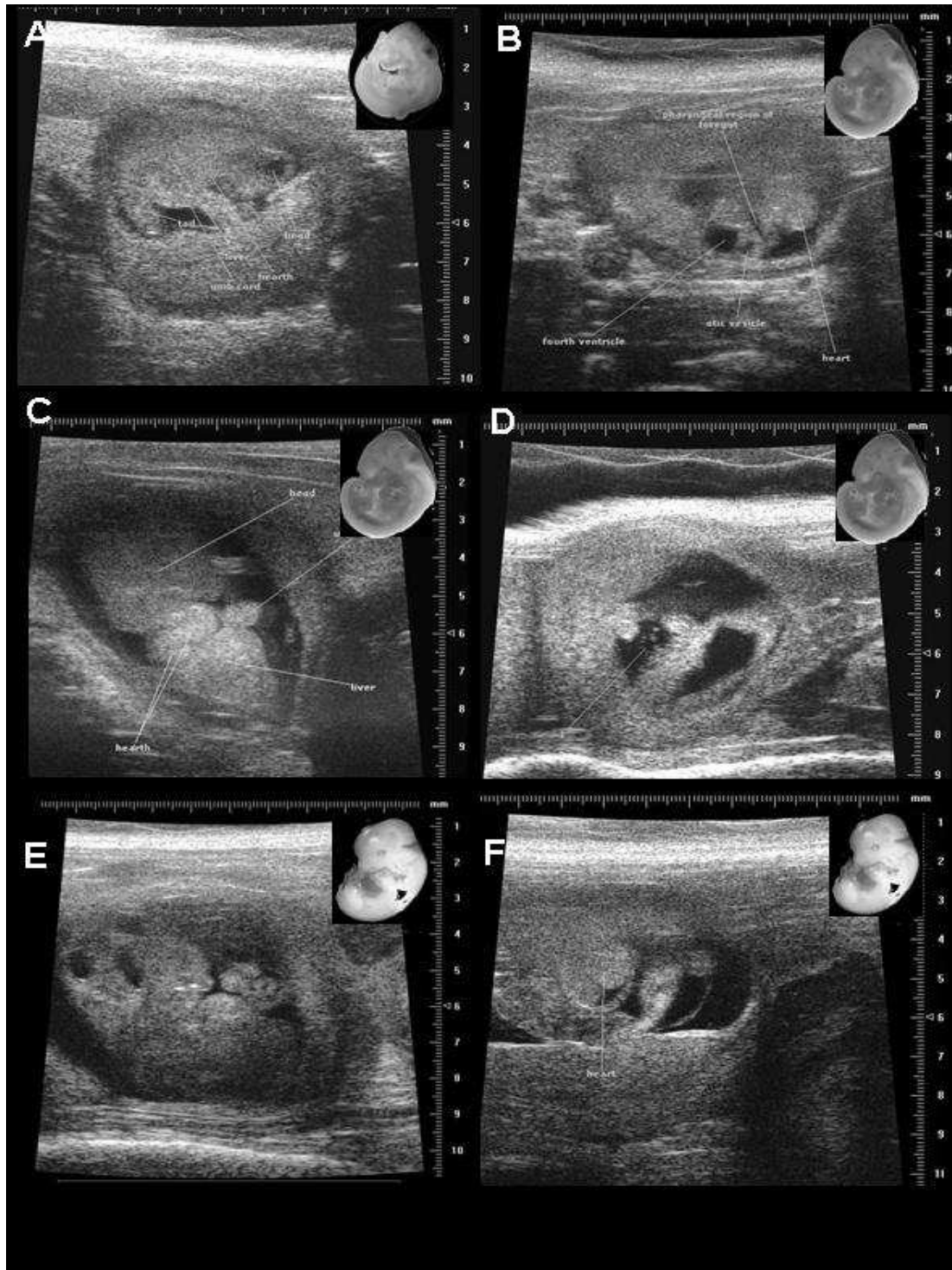


Figure 5. UBM imaging of the period of organogenesis completion (Days 10.5-12.5; TS 17-21). (A) On Day 10.5 (TS 17-18) it is possible to identify the optic vesicle in the embryonic head (head), the common atrial chamber in the heart primordium (heart) and the hepatic primordium (liver). (B-F) On Days 11.5 and 12.5 (TS 19-21), it is possible to accurately observe details of the head structures and the cardiovascular system, particularly the left and right heart ventricles (C and F).

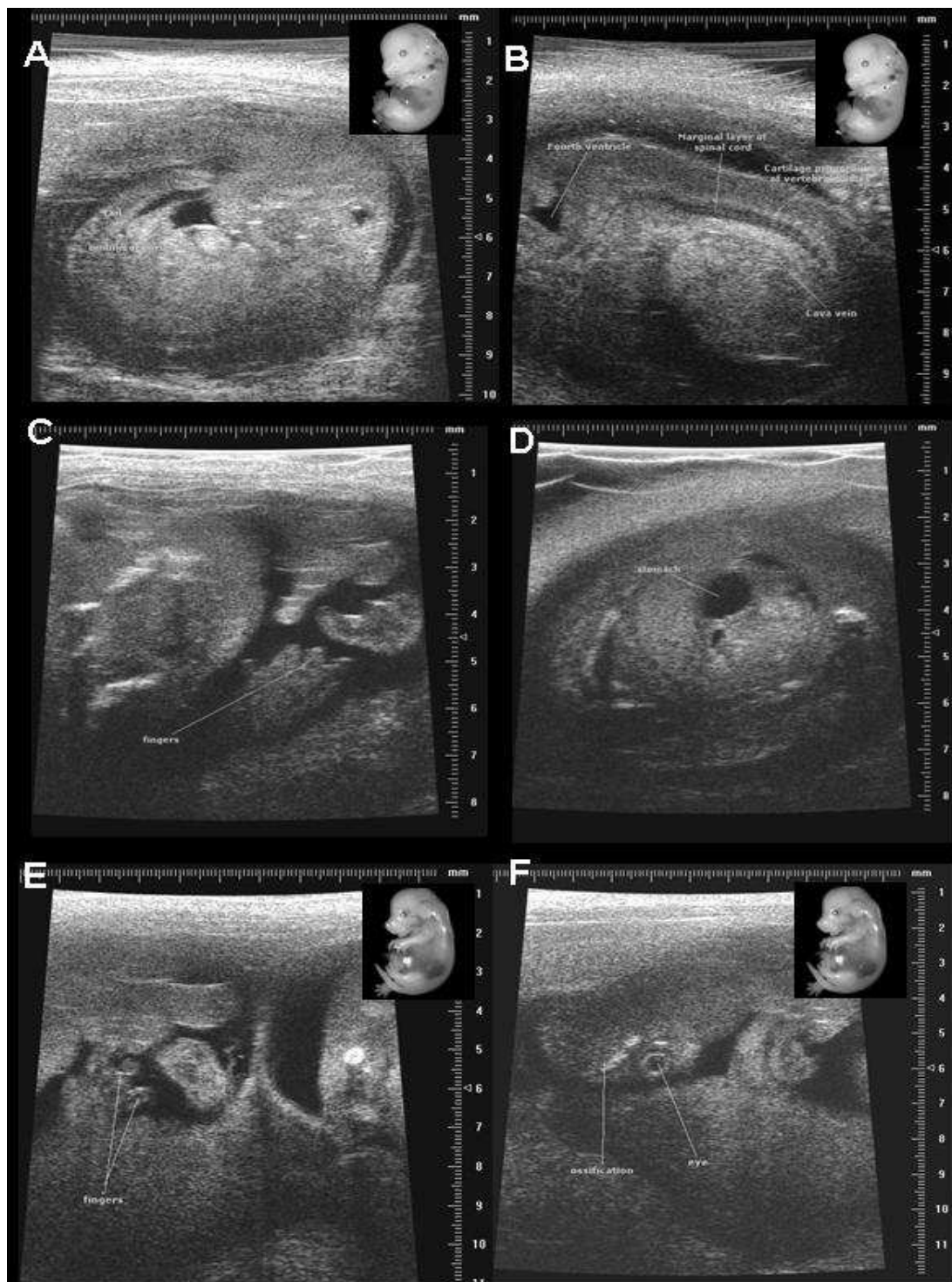


Figure 6. UBM imaging of the late embryonic period (Days 13.5-15.5; TS 22-24). (A) External features of a Day 13.5 embryo (TS 22), and (B) the fourth ventricle, the spinal cord and vertebral bodies, and the venae cavae in longitudinal sections of an embryo at the same stage. (C and D) On Day 14.5 (TS 23), it is possible to image details of organs such as the stomach (C) and of handplate interdentation (D). (E and F) On Day 15.5 (TS 24), handplate interdentation gives rise to well-defined digits (E), and ossification processes are clearly visible (F).

## Discussion

This study confirms the suitability of both MRI and UBM for non invasive in vivo and in utero assessment of mouse embryonic development. MRI was found to be adequate for imaging pregnancy structures and the embryo proper, in agreement with previous non-destructive studies carried out ex vivo [5] and in vivo [7]. Moreover, MRI may be the preferred method for studies of embryo lethality and intrauterine growth retardation because it allows the entire uterus and all the embryos inside to be viewed and accurately measured. In contrast, in our experience, and in disagreement with the report by Kulandavelu and co-workers [13], UBM is a very inefficient method for fetal counting. This is because the use of the high frequency probe (40 MHz) restricts exploration to a limited range (around 10 mm in area and depth), so that some conceptuses are not detected as the probe is moved over the maternal abdomen.

On the other hand, the major advantage of the high frequency of the UBM probe is its high resolution, of 30-50  $\mu\text{m}$ . This is crucial for detailed study of cellular components in organs and tissues during conceptus development, and fulfills the long-standing aim to develop non-invasive techniques for morphogenetic analysis at a resolution close to that of conventional histology. The images produced in the current study, in terms both of the structures detected and the timing of visualization, are equivalent to images previously obtained in histological studies [3, 15]. Moreover, the resolution of UBM imaging is likely to be improved significantly in the near future, as technical limitations are overcome [16, 17]. The main limitation to be overcome is the low penetrance of the high frequencies used (5-10 mm depending on the transducer). Another consideration is that UBM is currently based on a single-element mechanical transducer instead of the multi-element electronic transducers used in conventional ultrasonography; this fact limits resolution and offers no possibility of changing the focal depth.

In the current study, the high resolution possible with current UBM technology permitted us to evaluate pregnancy from Day 4.5, as a result of the detection of the endometrial reaction at sites of implantation, which occurs around this time [15]. In previous reports, the earliest reported visualizations of pregnancy were on Day 6.5 [13] and 8.5 [18]; so our study, to our knowledge, describes the earliest detection of pregnancy by ultrasound imaging in the mouse.

Our study also provides the first description of serial visualization, by daily scanning, of embryonic/fetal structures in the mouse from implantation to the end of organogenesis. Previous in vivo studies provided valuable detailed information on embryo and placental circulation, but were mainly based on isolated observations on selected days [13, 18-24]. UBM is a particularly appropriate method for dynamic assessment of the development of the embryonic cardiovascular system and embryo-placental circulation, whilst the use of MRI for these studies is limited by the need for high doses of gadolinium chelate contrast agents [25, 26]. High resolution UBM also has potential for sequential observations of other areas of current interest in morphogenesis, such as the differentiation of the placenta [27], the neural crest [28] the cephalic region [29], the eye [30], the lungs, liver and kidney [31-33], the spinal cord [34], the skeletal system [35] and the limb buds [36].

The use of UBM in sequential studies would be especially favored by the possibility of scanning animals without anesthesia. In addition to benefits for animal welfare, this would avoid any effects of repeated anesthesia on mother and fetuses. This is important because even a single session of anesthesia can alter fetal circulatory parameters such as heart rate and placental blood flow, and the consequences are likely to be especially serious with serial repetition [37]. Avoiding anesthesia thus increases the reliability of UBM, particularly in cardiovascular studies. The stress caused by keeping restrained pregnant mice awake is

minimized by recording the UBM scans with the machine's cine-loop option. This allows animals to be released quickly: in our hands, a complete examination of each female took approximately 3-4 minutes. Short duration of exposure to ultrasound also avoids the risk of inducing changes in pre- and post-natal growth and development; however, this is not a major concern since such effects have only been reported with exposures longer than 30 minutes and at frequencies below 3.5 MHz [38].

## Conclusions

Both MRI and UBM are reliable techniques for in utero imaging of litter features and phenotypic changes during embryo development in the mouse. MRI emerges as the better option for studies of embryo lethality and intrauterine growth retardation because it allows imaging and measurement of the entire uterus and all the embryos inside. UBM is feasible for in utero microscopic imaging of embryo features from implantation to the end of organogenesis, and can be used without anesthesia over short scan times. These two features together make UBM an outstanding technique for in vivo virtual histology of morphogenesis in mice, particularly for assessment of hemodynamic changes in the cardiovascular system.

## Acknowledgements

The authors thank the staff of CNIC Animal Unit for skilled technical assistance. Editorial assistance was provided by Dr. S. Bartlett. This study was carried out as part of a collaborative project (CC07-018) between the CNIC and the INIA. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation, the INIA is supported by the Spanish Ministry of Education and Science Affairs; there were no other outside funding.

## References

1. Foster, H.L. The mouse in biomedical research. Vol 3. (Embryology), Academic Press Ltd., London (UK), 1983: 134-135.
2. Marshall, E. The rise of the mouse: biomedicine's model mammal. *Science* 288:248-257, 2000.
3. Theiler, K. The house mouse: atlas of embryonic development. Springer-Verlag, New York 1992: 178 pp.
4. Russell, WM. The development of the three Rs concept. *Altern. Lab. Animals* 23: 298-304, 1995.
5. Dhenain, M.; Ruffins, S.W.; Jacobs, R.E. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Dev. Biol.* 232: 458-470, 2001.
6. Brune, R.M.; Bard, J.B.L.; Dubreuil, C.; et al. Early changes in water diffusion, perfusion, T1, and T2 during focal cerebral ischemia in the rat studied at 8.5 T. *Magn. Reson. Med.* 41:479-485, 1999.
7. Hogers, B.; Gross, D.; Lehmann, V.; et al. Magnetic resonance microscopy of mouse embryos in utero. *Anat. Rec.* 260:373-377, 2000.
8. Chapon, C.; Franconi, F. ; Roux, J. ; et al. In utero time-course assessment of mouse embryo development using high resolution magnetic resonance imaging. *Anat. Embryol.* 206:131-137, 2002.
9. Schneider, J.E.; Bamforth, S.D.; Farthing, C.R.; et al. High-resolution imaging of normal anatomy, and neural and adrenal malformations in mouse embryos using magnetic resonance microscopy. *J. Anat.* 202:239-247, 2003.
10. Pielies, G.; Geyer, S.H.; Szumska, D.; et al. MicroMRI-HREM pipeline for high-throughput, high-resolution phenotyping of murine embryos. *J. Anat.* 211:132-137, 2007.
11. Pallares, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Non-invasive ultrasonographic characterization of phenotypic changes during embryo development in non-anesthetized mice of different genotypes. *Theriogenology* (in press) 2008.

12. Pallares, P.; Gonzalez-Bulnes, A. Intrauterine Growth Retardation in Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice Is Established from Early Stages of Pregnancy. *Biol. Reprod.* (Epub ahead of print) 2008.
13. Kulandavelu, S.; Qu, D.; Sunn, N.; Mu, J.; et al. Embryonic and neonatal phenotyping of genetically engineered mice. *ILAR J.* 47:103-117, 2006.
14. Evans, H.E.; Sack, W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anat. Histol. Embryol.* 2:11-45, 1973.
15. Kaufman, M.H. The atlas of mouse development. Academic Press Ltd., London (UK), 1992: 512 pp.
16. Sakadzic, S.; Wang, L.V. High-resolution ultrasound-modulated optical tomography in biological tissues. *Opt. Lett.* 29:2770-2772, 2004.
17. Aristizabal, O.; Ketterling, J.A.; Turnbull, D.H. 40-MHz Annular Array Imaging of Mouse Embryos. *Ultrasound Med. Biol.* 32:1631-1637, 2006.
18. Ji, R.P.; Phoon, C.K.L.; Aristizabal, O.; McGrath, K.E.; et al. Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ. Res.* 92:133-135, 2003.
19. Lickert, H.; Takeuchi, J.K.; von Both, I.; et al. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodeling complexes in heart development. *Nature* 432:107-112, 2004.
20. Phoon, C.K.L.; Turnbull, D.H. Ultrasound biomicroscopy-Doppler in mouse cardiovascular development. *Physiol. Genomics* 14:3-15, 2003.
21. Phoon, C.K.L.; Aristizabal, O.; Turnbull, D.H. 40 MHz Doppler characterization of umbilical and dorsal aortic blood flow in the early mouse embryo. *Ultrasound Med. Biol.* 26:1275-1283, 2000.
22. Phoon, C.K.L.; Ji, R.P.; Aristizabal, O.; et al. Embryonic heart failure in NFATc1-/- mice. Novel mechanistic insights from in utero ultrasound biomicroscopy. *Circ. Res.* 95:92-99, 2004.
23. Zhou, Y.Q.; Foster, F.S.; Qu, D.W.; et al. Applications for multifrequency ultrasound biomicroscopy in mice from implantation to adulthood. *Physiol. Genomics* 10:113-126, 2002.
24. Zhou, Y.Q.; Foster, F.S.; Parkes, R.; et al. Developmental changes in left and right ventricular diastolic filling patterns in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H1563-H1575, 2003.
25. Taillieu, F.; Salomon, L.J.; Siauve, N.; et al. Placental perfusion and permeability: simultaneous assessment with dual-echo contrast-enhanced MR imaging in mice. *Radiology* 241:737-745, 2006.
26. Yeh, B.M. Science to Practice: Has the Time Arrived to Image Placental Perfusion?. *Radiology* 241:633-634, 2006.
27. Mardon, H.; Grewal, S.; Mills, K. Experimental models for investigating implantation of the human embryo. *Semin. Reprod. Med.* 25:410-417, 2007.
28. Dupin, E.; Creuzet, S.; Le Douarin, N.M. The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv. Exp. Med. Biol.* 589:96-119, 2006.
29. Chai, Y.; Maxson, R.E. Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev. Dyn.* 235: 2353-2375, 2006.
30. Tedesco, R.C.; Vitor, R.W.; Brandão, G.P.; et al. Ocular toxoplasmosis signs in mice embryo. *Micron* 38:729-733, 2007.
31. Dressler, G.R. The cellular basis of kidney development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22:509-529, 2006.
32. Maeda, Y.; Davé, V.; Whitsett, J.A. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol. Rev.* 87:219-244, 2007.
33. Zorn, A.M.; Wells, J.M. Molecular basis of vertebrate endoderm development. *Int Rev Cytol.* 259:49-111, 2007.
34. Levine, A.J.; Brivanlou, A.H. Proposal of a model of mammalian neural induction. *Dev. Biol.* 308:247-256, 2007.
35. Padmanabhan, R.; Abdulrazzaq, Y.M.; Bastaki, S.M.; et al. Intrauterine growth restriction and skeletal variations in mouse fetuses induced by vigabatrin administered at preimplantation stages of development. *Congenit. Anom. (Kyoto).* 48:29-39, 2008.
36. Duboule, D.; Tarchini, B.; Zákány, J.; et al. Tinkering with constraints in the evolution of the vertebrate limb anterior-posterior polarity. *Novartis Found. Symp.* 284:130-137, 2007.
37. Mazze, R.I.; Wilson, A.I.; Rice, S.A.; et al. Fetal development in mice exposed to isoflurane. *Teratology* 32:339-345, 1985.
38. Rao, S.; Ovchinnikov, N.; McRae, A. Gestational stage sensitivity to ultrasound effect on postnatal growth and development of mice. *Birth Defects Res. Clin. Mol. Teratol.* 76:602-608, 2006.





**ANEXO 2. PUBLICACIONES RELACIONADAS  
CON ESTA MEMORIA EXPERIMENTAL**





Paralelamente al desarrollo de esta memoria de Tesis se ha diseñado y validado un protocolo para inducción y sincronización del celo y la ovulación en ratón, que facilitase el manejo de los grupos experimentales; que se encuentra en proceso de patente (P-200702376) y cuyos resultados se encuentran en vía de publicación,

#### Comunicaciones en Congresos

*Synchronization of Oestrus and Ovulation in Mice by Administration of Progesterone and Prostaglandin Analogues* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). 16th International Congress on Animal Reproduction. Budapest (Hungria), 13-17 Julio 2008.

#### Artículos Científicos

*A New Method for Induction and Synchronization of Oestrus and Fertile Ovulations in Mice by using Exogenous Hormones* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en The Veterinary Journal.

Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio para la adaptación de la ultrasonografía biomicroscópica al estudio de otros aspectos de la reproducción en ratón; concretamente, de la actividad ovárica,

#### Artículos Científicos

*Feasibility of Ultrasound Biomicroscopy for Non-Invasive, Sequential and Translational Assessment of Ovarian Features in Rodent Models* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en The European Journal of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Biology.

#### Comunicaciones en Congresos

*Synchronization of oestrus and ovulation in mice by administration of progesterone and prostaglandin analogues* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). 16th International Congress on Animal Reproduction. Budapest (Hungria), 13-17 Julio 2008.



## Synchronization of oestrus and ovulation in mice by administration of progesterone and prostaglandin analogues

Pallares, P<sup>1,\*</sup> and Gonzalez-Bulnes, A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fundacion CNIC. Madrid, Spain

<sup>2</sup>Dpto. Reproduccion Animal. INIA. Madrid, Spain

---

### *Introduction*

Management of the oestrous cycle in the mouse is scarce. Usual methods for induction of behavioural oestrus and ovulation are “male effect”, by the introduction of a male, fertile or vasectomized and “Whitten effect”, by the exposition to male pheromones; however, the degree of oestrus synchronization reached with these methods is very limited. Thus, we aimed to design and establish a protocol for induction and synchronization of oestrus and ovulation in mice, based in exogenous hormones.

### *Material and methods*

In four consecutive experiments, a total of 72 adult mice in breeding age were used to evaluate effectiveness of the use, alone and combined, of exogenous progesterone and prostaglandin analogues. Different strains (37 BALB/c, 10 C57BL/6 and 25 CD1) were treated for testing breed effects. All the animals were maintained at the facilities of the CNIC Animal Laboratory Unit in Madrid, Spain.

### *Results*

The higher synchronization degree and the higher fertility rates were obtained by the use of a protocol consisting of two i.p. doses of 0.5µg of cloprostenol, three days apart, plus a single s.c. dose of 3µg of progesterone coincidentally with the first injection of cloprostenol. Within main advantages of the new method, we have to highlight the short time elapsed for appearance, and the high degree of synchronization, of oestrus and ovulations (almost 100% of the animals responding to the treatment in 48h; 78.4% with fertile mates at 24h), plus the high fertility rate obtained after a programmed mating (100%). The response was very repeatable between replicates, which may be related to a high synchronization of the ovarian stage at induction of luteolysis and introduction of the male. There were not found significant differences between strains, except the expected effect on prolificacy ( $P < 0.01$ ). These yields are superior to those obtained by classical methods based on the introduction of males. Eighty per cent of the control females, exposed to the male without prior hormonal treatment, showed vaginal plugs during the first 96h after male introduction; however, in the responding females, the oestrus were expanded at 24 (12.5% of the mice), 48 (25%), 72 (50%) and 96 h (12.5%). Pregnancy rate in control females was 80%.

### *Conclusion*

The proposed protocol arises as an adequate alternative for reproductive management in mice.



## Artículos Científicos

*A new method for induction and synchronization of oestrus and fertile ovulations in mice by using exogenous hormones* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en The Veterinary Journal.





## A new method for induction and synchronization of oestrus and fertile ovulations in mice by using exogenous hormones

Pilar Pallares<sup>1</sup> and Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Melchor Fernandez Almagro 3. 28029-Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Dpto. de Reproduccion Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid, Spain.

---

### Abstract

Four consecutive experiments were conducted to design and establish the effectiveness of different protocols for induction and synchronization of oestrus and ovulation in mice. Results showed that the higher synchronization degree and the higher fertility rates were obtained by the use of two i.p. doses of 0.5µg of cloprostenol, three days apart, plus a single s.c. dose of 3µg of progesterone coincidentally with the first injection of cloprostenol. Within main advantages of the new method, we have to highlight the short time elapsed for appearance, and the high degree of synchronization, of oestrus and ovulations (almost 100% of the animals responding to the treatment in 48h; 78.4% with fertile mates at 24h), plus the high fertility rate obtained after a programmed mating (100%). Overall, these yields are superior to those obtained by classical methods based on the use of male pheromones, so the proposed protocol arises as an adequate alternative for reproductive management in mice.

*Keywords:* Mouse; oestrus-synchronization; progesterone; prostaglandin.

---

Corresponding author: Pilar Pallares. Phone: 00 34 91 453 12 02. FAX: 0034 91 453 12 65.  
E-mail: ppallares@cnic.es (P. Pallares)

### Introduction

Management of the oestrous cycle in the mouse, even being a species widely used for research purposes worldwide (Foster, 1983; Marshall, 2000), is scarce. Usual methods for induction of behavioural oestrus and ovulation are “male effect”, by the introduction of a male, fertile or vasectomized (Whitten, 1958) and “Whitten effect”, by the exposition to male pheromones (Whitten, 1959); however, the degree of oestrus synchronization was early reported to be very limited (Bronson and Whitten, 1968). Thus, the application of a reliable method for oestrus synchronization, with fertile ovulation and mating, in a group of animals, in a short time-range, would be of interest for improving animal management (controlling and planning the reproduction of different individuals and groups in the animal units, in presence or absence of superovulatory effects), biotechnology (artificial insemination, combination with gonadotrophin superovulatory protocols for embryo recovery and induction of pseudopregnant fosters for embryo transfer), research (scheduling standardized and consistent experimental groups with synchronized mates for generation of synchronised pregnancies either for stage-specific studies on embryonic development or for obtaining synchronized deliveries in studies on neonates), and wellbeing (reducing the number of experimental animals and refining the studies).

Induction and/or synchronization of oestrous cycle is routinely achieved, both in humans and other animal species, by supplying different combinations of hormones; luteolytic

(prostaglandin F2 $\alpha$ , PGF2 $\alpha$ , and its analogues) and progestative (progesterone and its analogues) factors are commonly used. Secretion of PGF2 $\alpha$  is the event that provokes the lysis of the corpus luteum in mammals (McCracken et al., 1972), giving way to a follicular phase with oestrus behaviour and, therefore, ovulation. Administration of exogenous PGF2 $\alpha$ , or its analogues, induces a rapid and controlled luteolysis. If given as a single injection, some of the females will be in non-luteal phase or in the very early or very late luteal phase and will fail to respond. The use of two injections several days apart ensures that all the animals will be at the correct stage of the cycle to respond with oestrus behaviour and ovulation. On the other hand, progestative hormones are applied during several days (either by daily supply or using systems for a slow release) for mimicking the secretory activity of a corpus luteum during luteal phase; withdrawal of the hormones would induce a follicular phase and, thus oestrus and ovulation. To be effective, the duration of the progestative treatment may surpass the active life of a possible corpus luteum in the ovary or may be combined with a luteolytic agent.

In view of these considerations, current manuscript describes the results obtained in several consecutive experiments developed to evaluate the suitability of different hormonal protocols based either in the administration, alone and combined, of exogenous progesterone and prostaglandin analogues for induction and synchronization of oestrus in mice. The experiments were consecutive, arising from the results obtained in the precedents, and evaluated the reproductive features (appearance of oestrus behaviour and ovulation, fertility and prolificacy rates) obtained in response to the application of the different treatments. For determining the influence of genotype on breeding performance and evaluating the possibilities for the application of the protocol in different animal facilities using different strains, we assessed the response of three breeds widely used and which are the basis of other strains. The final aim was to design a simple and effective protocol able to be used in practice, SINCEL, which is currently pending of patent (application number P-200702376).

## Material and methods

### *Animals and husbandry*

A total of 72 adult mice, between 6-8 weeks old, were used. Different strains (37 BALB/c, 10 C57BL/6 and 25 CD1) were combined in the different experiments for testing breed effects. All the animals were maintained at the facilities of the CNIC Animal Laboratory Unit in Madrid, Spain. The lighting cycle was 14h:10h light:dark, respectively (07:30 on; 21:30 off). Humidity was maintained at  $50 \pm 5\%$  and the temperature was  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . CNIC Animal Unit meets the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. The experiment was carried out under Project License PA176/07 from the CNIC Scientific Ethic Committee. Animal manipulations were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 about the protection of animals used in experimentation.

### *Experimental procedure*

Experiment 1. Comparison of the effect obtained by the administration of either progestative or luteolytic hormones.

The objective of this experiment was to test effectiveness of treatments either with progestative or luteolytic hormones for synchronizing fertile oestrus in mice. A total of 15 CD1 females, divided in 3 groups of 5 each one, was considered. The first group (P4CR) was treated by the subcutaneous insertion, on Day -6, of a device for controlled release (Alzet Osmotic Pumps, Durect Co., Cupertino, CA) containing 9 $\mu\text{g}$  of progesterone (4-pregnen-

3,20-diona, Siemsgluss Iberica, Barcelona, Spain); the device was changed by a new one on Day -3, that was maintained until Day 0. The second group (2PGF) was treated by the administration of two intraperitoneal doses of 0.5µg of cloprostenol (Estrumate, Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, G), three days apart (Days -3 and 0). The first (Group C) was used as control, being treated by the introduction of fertile males in a rate of 1:1 on Day 0. Fertile males were also introduced in a rate of 1:1 to groups P4 and PGF on Day 0. Thereafter, appearance of oestrus was determined, every morning for 4 days, by evaluating presence of a vaginal plug as result of overnight mating; male was taken out in the morning when a vaginal plug was detected. Fertility and prolificacy rates were established at delivery.

Experiment 2. Effect of the administration of protocols combining prostaglandins and a short-acting dose of progesterone.

The objective of this experiment arises from the previous one and was to test if effectiveness of treatments with prostaglandins may be increased by a supply of progesterone with the first prostaglandins dose, mimicking a luteal phase in all the animals, or even a single dose of prostaglandin and progesterone would be successful. A total of 25 animals (15 BALB/c and 10 C57BL/6) were used. Two groups of BALB/c (2PGF, n=5, and C, n=5) were treated as described in experiment 1; breed effects can be determined by comparing both trials. The remaining animals were treated by combining a single short-acting dose of progesterone and PGF2α, either in a single (P4/PGF, n=5 C57BL/6) or double dose (P4/2PGF, n=10, being 5 C57BL/6 and 5 BALB/c for testing strain effects). Treatment of the group P4/2PGF was similar to group 2PGF but including the subcutaneous administration of a single dose of 3µg of progesterone in 0.2ml of saline, coincidentally with the first injection of cloprostenol on Day -3. Treatment of the group P4/PGF consists of a single dose of progesterone plus a single dose of cloprostenol on Day 0. Fertile males were introduced in a rate of 1:1 to all the groups on Day 0. Appearance of oestrus behaviour and rates of fertility and prolificacy were determined as previously described.

Experiment 3. Effect of the progesterone dose in protocols combining single doses of prostaglandins and progesterone.

The objective of this experiment was to determine if effectiveness of treatments with a single dose of prostaglandin and progesterone would be increased by increasing the dose of progesterone applied. A total of 15 BALB/c, divided in 3 groups were used. All the groups were treated, on Day 0, with a single dose of cloprostenol plus a single dose of 3, 6 and 9µg progesterone. Fertile males were introduced in a rate of 1:1 to all the groups on Day 0. Appearance of oestrus behaviour and rates of fertility and prolificacy were determined as previously described.

Experiment 4. Repeatability of the response to the administration of a single progesterone dose and a double prostaglandin injection (protocol SINCEL).

The objective of this experiment arises from the previous to compare repeatability of the protocol SINCEL in different trails and strains. Two replicates, having 7 BALB/c and 10 CD1 females, were treated with two intraperitoneal doses of 0.5µg of cloprostenol on Days -3 and 0 and a subcutaneous single dose of 3µg of progesterone in saline on Day -3. Fertile males were introduced in a rate of 1:1 to all the groups on Day 0. Appearance of oestrus behaviour and rates of fertility and prolificacy were determined as previously described.

#### *Statistical analysis*

Statistical treatment of data regarding the effect of treatments on the day of onset of estrus behaviour and mating and on fertility and prolificacy rates were examined by analysis of

variance (ANOVA) for the effects of treatment and genetic background within treatment. Analysis of data expressed as percentages were done after transformation to the arcsine. Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and the statistical significance was accepted from  $P < 0.05$

## Results

### *Effects of the administration of either progestative or luteolytic hormones.*

Sixty per cent of the control females, exposed to the male without prior hormonal treatment, showed vaginal plugs during the first 96h after male introduction; one of them showed the plug at 24h, the remaining were found at 72h (Figure 1A). Eighty per cent of females showed signs of mating in both groups treated with exogenous hormones. In the group treated with progesterone (P4CR), most of the animals (75%) showed oestrus at 24h after device removal, while the remaining showed vaginal plugs at 72h. Conversely, the appearance of plugs was delayed until 72 and 96h (75 and 25%, respectively) in the group treated with prostaglandins (2PGF). Fertility rates were 100% in control and P4CR, but decreased to 50% in 2PGF ( $P < 0.05$ ); on the other hand, there were not found significant differences in prolificacy rate ( $12.6 \pm 0.4$ ,  $11.3 \pm 0.6$  and  $10.0 \pm 0.4$ , respectively).

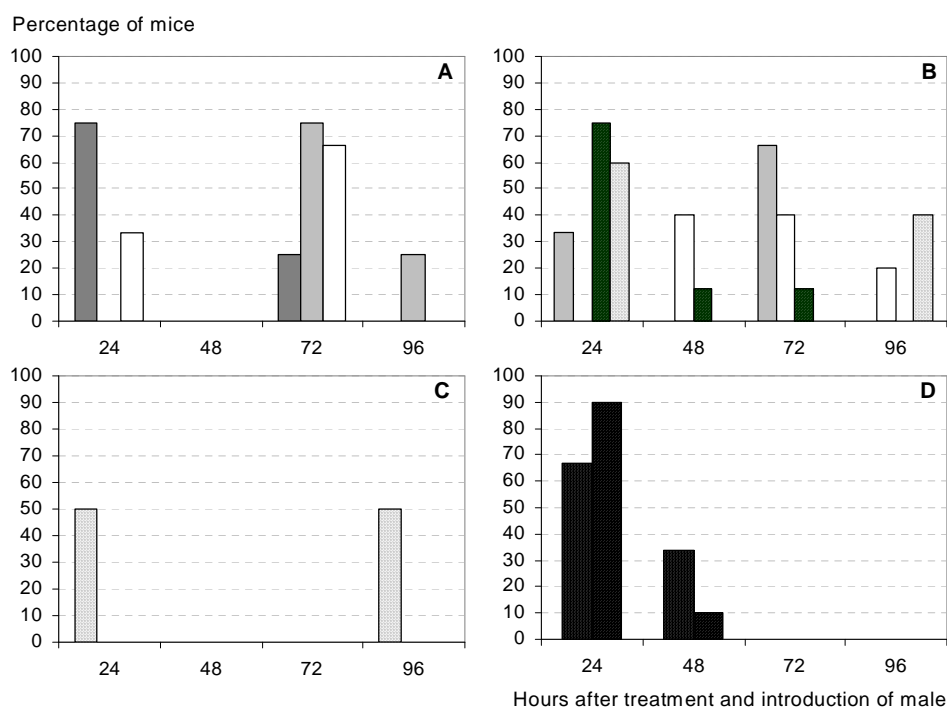


Figure 1. Percentage of mice showing vaginal plugs at different times after treatment for induction and synchronization of oestrus and ovulation in mice, based in the use, alone and combined, of exogenous progesterone and prostaglandin analogues. Figure 1A, response in control untreated group (white bar) and in mice treated either with prostaglandins or progesterone (light and dark grey bars, respectively). Figure 1B, response in control untreated group (white bar) and in mice treated either with prostaglandin (light grey bar) or with a single short-acting dose of progesterone and a single or double dose of prostaglandin (dotted grey and dotted black bars, respectively). Figure 1C, response in females treated with a single dose of prostaglandin and a single progesterone dose of 3 (dotted grey bar), 6 and 9  $\mu$ g (no response). Figure 1D, response in two replicates treated with a single progesterone dose and a double dose of prostaglandin (dotted black bars).

*Effect of the administration of protocols combining prostaglandins and a short-acting dose of progesterone.*

All the control females showed appearance of vaginal plugs, but expanded at 48 (40%), 72 (40%) and 96 h (20%); pregnancy and prolificacy rates were 60% and  $6.6 \pm 0.4$ . The response in the group treated with prostaglandins alone (2PGF) only reached 60% ( $P < 0.05$ ); the timing of appearance of plugs was similar to found in previous experiment, with most of the mice (66.7%) showing plugs at 72 hours (Figure 1B). All the females become pregnant, with a mean number of offspring of  $5.6 \pm 0.6$ . In the groups treated with a single short-acting dose of progesterone and PGF $2\alpha$ , either in a single (P4/PGF) or double dose (P4/2PGF), the percentage of animals showing vaginal plugs were 100 and 80%, respectively. In the first group, sixty per cent of the animals showed vaginal plugs at 24h; the remaining mice showed to have been mated at 96h. Appearance of oestrus signs was more concentrated in P4/2PGF, with 75% of animals showing oestrus at 24h ( $P < 0.05$ ), without significant differences between strains. Pregnancy rate were 100% in both treatment and the litter size was  $5.3 \pm 0.4$  for P4/PGF, and  $5.3 \pm 0.4$  for BALB/c and  $6.2 \pm 0.6$  for C57BL/6 in P4/2PGF.

*Effect of the progesterone dose in protocols combining single doses of prostaglandins and progesterone.*

Eighty per cent of the mice showed vaginal plugs in the group treated with 3 $\mu$ g of progesterone; half of them showed mating signs at 24 h and half of them at 72 h (Figure 1C). On the other hand, there was no mating behaviour in the groups treated with 6 and 9 $\mu$ g of progesterone.

*Repeatability of the response to the administration of the protocol SINCEL.*

Overall, the 80.4% of the mice (66.6% in the first and 90% in the second replicate) showed oestrus behaviour at 24 h, as depicted in Figure 1D; the remaining showed vaginal plugs at 48h. Fertility rates were 100 again and prolificacy was  $8.3 \pm 0.6$  for BALB/c and  $11.7 \pm 0.6$  for CD1. When combining with the results of the group P4/2PGF in the experiment 3.2, the mean percentage of animals mated at 24h was 78.4%. There were not found significant differences between replicates and strains, except the expected effect of the strain on prolificacy.

## Discussion

Current results clearly demonstrate the usefulness of protocols based in the combination of progesterone and prostaglandins, mainly of the proposed protocol SINCEL, for the induction and synchronization of fertile oestrus and ovulation in mice.

A detailed analysis of the results found in the different experiments performed indicates, in the first trial, that the use of two luteolytic doses of prostaglandin analogues induces appearance of oestrus and ovulation. However, the results are quite similar to that found in the control group and in the literature described elsewhere for male effect; most of the animals showed vaginal plugs around 72 h after the second injection. By comparing results in first and second replicate we can hypothesize that, as with the male effect, the response and timing of response, and even fertility and prolificacy, by using two doses of prostaglandins alone are very dependent on the moment of the oestrous cycle when applied. These findings resemble those previously found in large animals, pointing to a lower fertility (Boland et al., 1978) and a higher variability in the timing of ovulation after PGF $2\alpha$  induced luteolysis (Barret et al., 2002); features related to a disruption of ovulatory follicle dynamics in different phases of the oestrous cycle (Gonzalez-Bulnes et al., 2005).

On the other hand, results from first experiment confirm the suitability of a long-term sustained release of progesterone for synchronizing reproductive features in mice in a short period, 24 h after progesterone release. These results would be very useful for the design of a simple and effective protocol for reproductive management of mice in practice. However, the use of subcutaneous devices has the inconveniences derived of the necessity of a surgical approach for applying/removing the tool under the skin.

Thus, a possible alternative was the application of progesterone by injecting subcutaneous doses; however, this makes necessary the use of several consecutive injections to surpass the active life of a possible corpus luteum in the ovary or may be combined with a luteolytic agent to avoid the permanence of such corpus luteum. Furthermore, the use of a single dose of progesterone coincidentally with a prostaglandin treatment would mimic the presence of a secretory corpus luteum and would unify the ovarian cycle and the response in the entire group of animals. In fact, the administration of progesterone in a single intramuscular dose is used in large animals from early studies on oestrus synchronization (Oldham et al., 1985). In ruminants, the appearance and quality of ovulations is known to be dependent on the stage of follicle development at the time of male introduction. A single injection of progesterone stimulates the emergence of a new follicular wave, able to grow and give adequate ovulations (Gonzalez-Bulnes et al., 2006).

Results of second experiment confirmed that the combined use of prostaglandin and a single dose of progesterone induces the appearance of synchronized and fertile oestrus and ovulation. It can be established a progesterone dosage around 3µg, from the results of the third experiment, since higher doses generate anoestrus; possible causes, mechanisms and applications of such finding deserve further studies. The comparison of the results found by applying single doses of progesterone and prostaglandin in second and third experiments showed that there are two peaks of appearance of vaginal plugs, at 24 and 96h, which we theorize to be determined by the stage of oestrous and ovarian cycle at treatment. On the other hand, the response was more uniform in the group treated with progesterone and two prostaglandin doses (protocol SINCEL); from the results of second and fourth experiment, almost the 100% of the animals were mated before 48h of the treatment; most of them (around 78.4%) at 24 h. The response to SINCEL was very repeatable between replicates, which may be related to a higher synchronization of the ovarian stage at induction of luteolysis and introduction of the male.

## Conclusions

In mice, the use of the protocol SINCEL synchronizes appearance of fertile ovulation at 24 h after second cloprostenol dose. This method arise as an adequate alternative to classical methods based on the use of male pheromones, due to a) the short time elapsed for appearance of oestrus and ovulations, the b) high degree of synchronization of such features and c) the high fertility rate after a programmed mating.

## Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Santiago Rodriguez and the staff of CNIC Animal Unit for skilled technical assistance. Current study was developed under a collaborative project (CC07-018) between CNIC and INIA. CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs

and the Pro-CNIC Foundation, whilst INIA is a research institute of the Spanish Ministry of Education; there were no other outside funding.

## References

- Barret, D.W., Bartlewski, P.M., Cook, S.J., Rawlings, N.C., 2002. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF $2\alpha$  given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology* 58, 1409–1424.
- Boland, M.P., Gordon, I.R., Kellcher, D.L., 1978. The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. *Journal of Agricultural Sciences of Cambridge* 91, 727–730.
- Bronson, F.H., Whitten, W.K., 1968. Oestrus-accelerating pheromone of mice; assay, androgen-dependency and presence in bladder urine. *Journal of Reproduction and Fertility* 15, 131–134.
- Foster, H.L., 1983. *The mouse in Biomedical Research*. Vol 3. (Embryology), Academic Press Ltd., London (UK), 134–135.
- Gonzalez-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Lopez-Sebastian, A., 2006. Development of preovulatory follicles in goats induced to ovulate using the male effect with and without progesterone priming. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 745–750.
- Gonzalez-Bulnes, A., Diaz-Delfa, C., Garcia-Garcia, R.M., Urrutia, B., Carrizosa, J.A., Lopez-Sebastian, A., 2005. Origin and fate of preovulatory follicles after induced luteolysis at different stages of the luteal phase of the oestrous cycle in goats. *Animal Reproduction Science* 86, 237–245.
- Marshall, E., 2000. The rise of the mouse: biomedicine's model mammal. *Science* 288, 248–257.
- McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K., Samuelsson, B., 1972. Prostaglandin F $2\alpha$  identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature* 238, 129–134.
- Oldham, C.M., Pearce, D.T., Gray, S.J., 1985. Progesterone priming and age of the ewe affect the life-span of corpora lutea induced in the seasonally anovulatory Merino ewe by the “ram effect”. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 29–33.
- Whitten, W.K., 1958. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. Changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *Journal of Endocrinology* 17, 307–313.
- Whitten, W.K., 1959. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *Journal of Endocrinology* 18, 102–107.





## Artículos Científicos

*Feasibility of Ultrasound Biomicroscopy for Non-Invasive, Sequential and Translational Assessment of Ovarian Features in Rodent Models* (Pilar Pallares y Antonio Gonzalez-Bulnes). En evaluación en The European Journal of Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Biology.



## Feasibility of Ultrasound Biomicroscopy for Non-Invasive, Sequential and Translational Assessment of Ovarian Features in Rodent Models

Pilar Pallares<sup>1</sup> and Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundacion Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Melchor Fernandez Almagro 3. 28029-Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Dpto. de Reproduccion Animal. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid, Spain.

---

Corresponding author: Pilar Pallares. Phone: 00 34 91 453 12 02. FAX: 0034 91 453 12 65.  
E-mail: ppallares@cnic.es (P. Pallares)

Dear Editor

We reflect on the possibilities of applying *in vivo* imaging techniques for the study of ovarian features in rodents. Currently, rodents are widely used as models for research in reproductive function and dysfunction. The research activities are mainly based in histological observation after necropsy or surgery. Histology has the inconvenience to be invasive and incompatible with sequential dynamic studies on the same animals; which are crucial in the ovary, an organ in continual change over time.

Thus, sequential dynamic studies of follicles of corpora lutea in rodents should be afforded by using non-invasive imaging methods, like in larger species. Ultrasonography (US) may be the imaging method of choice. First, enables real-time viewing. Second, contributes to the improvement of animal conditions, reducing the number of experimental animals and refining the studies, in agreement with the philosophy of the 3Rs model of Russell and Burch (refinement, reduction and replacement; 1). Furthermore, when using animal models in biomedicine, the studies may be essentially translational to humans; this is facilitated to the top by the application of the same diagnostic and observational techniques in experimental studies and clinical practice.

However, conventional US (3.5-15 MHz) is inadequate for visualizing the small size of the ovary, follicles and corpora lutea of rats and mice, since provides a spatial resolution on the order of millimetres, insufficient for distinguishing the ovary and its structures from adjacent tissues. This aim may be reached by the use of ultrasound biomicroscopy (UBM). UBM is an ultra-high frequency (between 30-55 MHz) pulse-echo method, firstly developed for real-time micro-imaging experimental studies in mice (2). The high frequencies of observation allow images closer to microscopy, with a resolution between 30–50  $\mu\text{m}$ , near to conventional histology, which can fulfil the long-standing endeavour of non-invasive, sequential and translational studies of ovarian function in rodent models.

Thus, our aim was to determine the accuracy and potential usefulness of UBM for imaging and measuring ovarian follicles and corpora lutea in living rats and mice.

A total of 12 C57BL/6J female mice and 4 Wistars female rats, in breeding age, were used, under Project License 156/07 from the CNIC Scientific Ethic Committee within a collaborative project (CC07-018) between CNIC and INIA with. For UBM imaging, the coupling between the skin and the transducer was improved by waxing the hair of the lumbar area and, thereafter, abundantly wetting the zone with carboxymethylcellulose gel. Scanning was performed by using a Vevo 770 (Visual Sonic Inc., Toronto, Canada) equipped with a

40 MHz probe. UBM was done by pressing the transducer on the skin and moving it for locating the kidney; each ovary was searched behind its ipsilateral kidney. After the ovary was identified, the probe was manipulated until the largest sections in transverse and sagittal planes were obtained. Scannings were recorded using the “cine-loop” option of the machine for later detailed observations. UBM visualization succeeded to localize the ovary in both rats and mice and provided outstanding images of both follicles and corpora lutea, as can be appreciated in the figure.

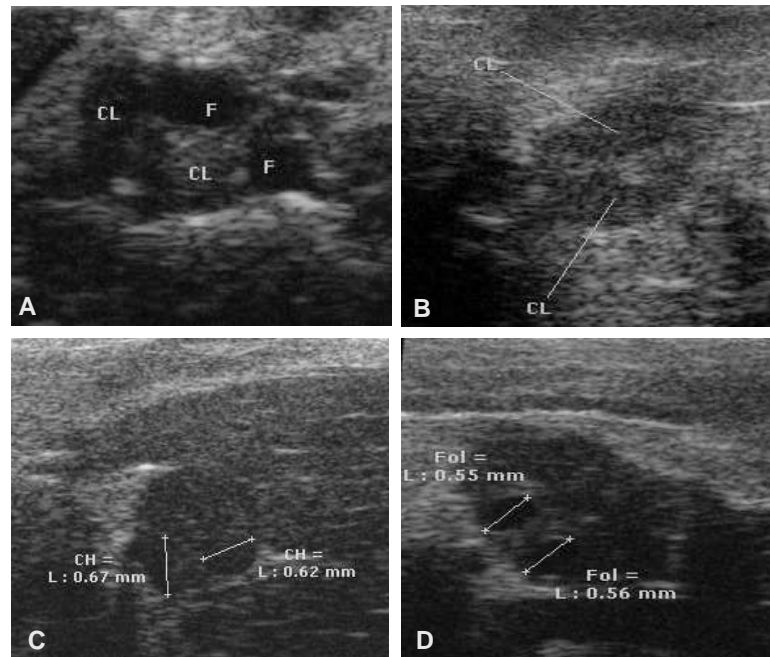


Figure 1. Imaging by ultrasound bi microscopy of the ovary in mice. A) corpora lutea (CL) and follicles (F) at early luteal phase; B) corpora lutea at mid-luteal phase (CL); C) corpora haemorrhagica after controlled ovarian stimulation (CH); D) anovulatory follicles (Fol) after controlled ovarian stimulation.

From current results, it is possible to know for certain that application of UBM to reproductive research in rodent models may be outstanding for implementation of sequential, dynamic and translational studies.

## References

1. Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Animals* 1995; 23: 298-304.
2. Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, Harasiewicz KA, Starkoski BG, Zan L, Knapik DA, Adamson SL. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28: 1165–72.

